CHIRALES ERKENNEN VERSCHIEDENER α-HYDROXYCARBONSÄUREDERIVATE DURCH CHIRASIL-VAL, ENTWICKLUNG EINES AUTOMATEN ZUR DERIVATISIERUNG IN DER CHROMATOGRAPHIE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Jürgen Gerhardt
aus Berlin

1984

CHIRALES ERKENNEN VERSCHIEDENER α-HYDROXYCARBONSÄUREDERIVATE DURCH CHIRASIL-VAL, ENTWICKLUNG EINES AUTOMATEN ZUR DERIVATISIERUNG IN DER CHROMATOGRAPHIE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Jürgen Gerhardt
aus Berlin

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 25. September 1984

Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Voelter

Abstract

Gerhardt, Jürgen:

CHIRALES ERKENNEN VERSCHIEDENER α-HYDROXYCARBONSÄURE-DERIVATE DURCH CHIRASIL-VAL, ENTWICKLUNG EINES AUTOMATEN ZUR DERIVATISIERUNG IN DER CHROMATOGRAPHIE

Verschiedene Derivate der 2-Hydroxycarbonsäuren sind zur gaschromatographischen Trennung der optischen Antipoden geeignet, so die 2-Acyloxycarbonsäureamide, die 2-Trimethylsiloxycarbonsäureamide, die 2-Carbamoyloxycarbonsäureester, die 2-Carbamoyloxycarbonsäureamide und die 2-Hydroxycarbonsäureester. In allen Fällen sind Wasserstoffbrückenbindungen die wesentlichsten Wechselwirkungen, die zu einer chiralen Erkennung führen. Jedes Derivat hat seine Vor- aber auch Nachteile, so daß die Wahl der Derivatisierung durch mehrere Faktoren bestimmt ist, die in der Matrix der Probe, in der zu trennenden Säure und der relativen Zusammensetzung der Isomeren zu suchen sind. Von weiteren stickstoffhaltigen Derivaten wurden thermodynamische Parameter bestimmt, um den Einfluß verschiedener Substituenten auf die chirale Erkennung zu bestimmen.

Da die Probenvorbereitung für die Gaschromatographie meist sehr zeitaufwendig ist und dadurch den Einsatz dieser Analytik in der Routine behindert, wurde ein Derivatisierungsautomat entwickelt, der speziell z.B. die quantitative Aminosäureanalyse mittels Gaschromatographie als Routineanalytik ermöglicht. Aber auch für die obengenannte Derivatisierung der 2-Hydroxycarbonsäuren, sowie in der Fettsäure- und Steroidanalytik ist er einsetzbar und erlaubt ein hohes Maß an Präzision und Reproduzierbarkeit.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer in der Zeit von August 1981 bis Mai 1984 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Ernst Bayer danke ich für die Stellung des Themas, seine großzügige Unterstützung und das rege Interesse an dieser Arbeit.

Folgenden Damen und Herren bin ich zu Dank verpflichtet:

Für viele Diskussionen und die Aufnahme zahlreicher Spektren (GC-MS) sowie Herstellung, Archivierung und Bereitstellung der Kapillaren danke ich Herrn G.J. Nicholson.
Herrn Dr. Hartmut Frank danke ich für zahlreiche Diskussionen.
Dank schulde ich auch Frau Karin Reichle für die Anfertigung des Manuskriptes.

Der heutige Mensch lacht
über den Unverstand der
Vorfahren und beginnt mit
stolzem Selbstvertrauen eine Reihe
von neuen Verwirrungen, über die
dann wieder die Nachkommen
lachen werden

- Nikolai Gogol -

Für Ursula, Daniel und Heike

INHALTSVERZEICHNIS

A.	EINLEITUNG	1
B.	ALLGEMEINER TEIL	4
1.	Die gaschromatographische Trennung der 2-Hydroxycarbonsäuren in ihre optischen Antipoden	4
1.1.	Einleitung	4
1.2.	Die Derivate der Hydroxycarbonsäuren	6
1.2.1.	Die Perfluoracyloxycarbonsäureamide	6
1.2.2.	Die Trimethylsiloxycarbonsäureamide	7
1.2.3.	Die Carbamoyloxycarbonsäureester	10
1.2.4.	Die Carbamoyloxycarbonsäureamide	13
1.2.5.	Die Hydroxycarbonsäureester	13
1.2.6.	Vor- und Nachteile der Derivate	19
2.	Betrachtung über das chirale Erkennen optisch aktiver Phasen	21
2.1.	Einleitung	
2.2.	Bestimmung thermodynamischer Parameter	22
2.3.1.	Die Darstellung von Selektor (Phase) und Substrat	26
2.3.2.	Die Wasserstoffbrückenbildner des Substrats	27
2.3.3.	Die Inkremente des Substrats	29
2.3.4.	Diskussion der einzelnen Inkremente	31
2.4.	Quantitative Bestimmung der Lösungs-enthalpiedifferenzen von Substraten in unterschiedlichen Phasen	38
2.4.1.	Die Meßwerte und Diskussion	41
2.5.	Zusammenfassung	44

3.	Automatisierung in der Gaschromatographie	48
3.1.	Einleitung	48
3.2.	Anwendungsbereiche	53
3.2.1.	Das Analyseverfahren "Enantiomer-labelling"	53
3.2.1.1.	Anwendung auf Aminosäuren	55
3.3.	Automatisierung der Derivatisierung	56
3.3.1.	Einleitung	56
3.3.2.	Die Anforderung an einen Derivatisierungsautomaten	58
3.3.3.	Derivatisierung der Aminosäuren	58
3.3.4.	Aufbau des Derivatisierungsautomaten	59
3.3.4.1.	Die Steuerung	62
3.3.4.2.	Das Transfersystem	62
3.3.4.3.	Die Dosiersysteme	66
3.3.4.4.	Der Ablauf	71
3.3.5.	Weitere Realisierungsmöglichkeiten	73
3.3.5.1.	Konzepte für einen kompakten Automaten	74
3.4.	Zusammenfassung	84
C.	EXPERIMENTELLER TEIL	86
1.	Darstellung von Diazomethan	86
2.	Reinigung von TEA	86
3.	Veresterung der α-Hydroxycarbonsäuren	86
4.	Umsetzung der α-Hydroxycarbonsäureester zu den Urethanen	87
5.	Darstellung der 2-Trimethylsiloxycarbonsäure-n-propylamiden	87
6.	Darstellung der 2-Heptafluorbutyroxycarbonsäureamide	88
7.	Darstellung der 2-Isopropylcarbamoyloxycarbonsäureisopropylamide	88
8.	Darstellung der N-TFA Aminoalkohole	88

9.	Darstellung der O-TMS-Aminoalkohole	89
10.	Darstellung der N-TFA O-TFA Aminoalkohol	89
11.	Darstellung der N-TFA O-TMS Aminoalkohol	89
12.	Darstellung der N(O,S)-PFP-Aminosäure-n-propylderivate	89
13.	Bestimmung der Reaktionskinetik	90
14.	Verwendete Gaschromatographen	90
D.	ZUSAMMENFASSUNG	92
E.	ANHANG	94
F.	LITERATURVERZEICHNIS	97

In dieser Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

CV	Chirasil-Val
GC	Gaschromatograph(isch)
HFB	Heptafluorbutyryl-
HPLC	High Pressure (Performance) Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie
PFP	Pentafluorpropionyl-
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoracetyl-
TMS	Trimethylsilyl-

Die Abkürzungen für Aminosäuren entsprechen denen der IUPAC-IUB-Nomenklatur-Kommission: Eur. J. Biochem. 27, 201 (1972); ibid 74, 1 (1977)

A. EINLEITUNG

Stereoselektivität ist ein allgemeines Phänomen biologischer Systeme. In vielen Fällen haben Enantiomere verschiedene Wirkung[1]. Bekannte Beispiele sind die Aminosäuren, 1-Phenyl-2-aminoalkohole wie Ephedrin und Phenylephrin[2]. Der Unterschied kann soweit gehen, daß ein Enantiomer sogar toxische Eigenschaften hat, wie dies bei L-Penicillamin der Fall ist, während D-Penicillamin als Medikament eingesetzt wird[3]. Beim Contergan haben toxikologische Untersuchungen ergeben, daß nur ein Enantiomer des als Racemat eingesetzten Wirkstoffs Thalidomid die teratogene Wirkung ausgelöst hat[4,5].

Diese Beispiele zeigen, daß es im Zuge der Entwicklung von Arzneimitteln unbedingt notwendig ist, bei racemisch vorliegenden Substanzen die Enantiomeren einzeln zu untersuchen. Dazu sind analytische Methoden notwendig, um ein Racemat möglichst direkt zu trennen. Die Enantiomerentrennung basiert auf zwei grundsätzlichen Methoden:

a) Die zu trennenden Enantiomeren werden mit einem optisch aktiven Reagenz derivatisiert und als Diastereomere an einem nicht chiralen chromatographischen System getrennt[6,7].

b) Die Enantiomeren werden direkt an einer chiralen stationären Phase nach der Derivatisierung mit einem nicht chiralen Reagenz getrennt[8].

Methode a) setzt je nach Substanzklasse verschiedene, optisch aktive Reagenzien hoher optischer Reinheit voraus. Sie müssen mit einer vorhandenen funktionellen Gruppe in eindeutiger Weise reagieren.

Methode b), die direkte Trennung an optisch aktiven stationären Phasen, wird heute sowohl in der Flüssig- bzw.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie[9] als auch in der Gaschromatographie angewandt.

Ein sehr breites Anwendungsgebiet der gaschromatographischen Enantiomerentrennung ist bei den Aminosäuren gegeben. Synthetische Peptide können damit leicht auf ihren Anteil an D-Aminosäuren untersucht werden[10,11]. Durch die Methode des Enantiomer-labellings ist eine einfache quantitative Bestimmung aller Aminosäuren möglich[12,13]. Die Genauigkeit liegt dabei über der der herkömmlichen Ionenaustauschchromatographie. Die Methode ist aber auch allgemein auf alle chiralen Substanzen anwendbar, die in ihre Enantiomeren getrennt werden können, wie z.B. die Hydroxycarbonsäuren, chirale Amine, β-Aminoalkohole, β- und γ-Aminosäuren, 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglykol. Systematische Fehler sind drastisch reduziert und somit die Reproduzierbarkeit der Analyse erhöht.

Die erfolgreiche gaschromatographische Enantiomerentrennung geht auf Gil-Av und Feibush[8,14-16] zurück. Als stationäre Phase wurde N-Trifluoracetyl-L-isoleucinlaurylester benutzt. Die Aminosäuren Alanin, Valin und Leucin konnten bei 80°C mit Retentionszeiten von bis zu sieben Stunden getrennt werden. Der Übergang zu thermisch stabileren Phasen führte zu einer kürzeren Analysendauer. Mit der Darstellung von Chirasil-Val durch Frank, Nicholson und Bayer[17] erhielt man erstmals eine Phase, deren thermische Stabilität ausreichte, alle Proteinaminosäuren in einem einzigen Analysengang zu trennen.

Erste theoretische Erklärungen der Enantiomerentrennung an optisch aktiven Phasen stammten von Gil-Av und Feibush[18]. Sie postulierten die Bildung eines diastereomeren Übergangskomplex. Die Assoziation zwischen stationärer Phase und zu trennendem Molekül erfolgt dabei über Wasserstoff-

brückenbindungen. Während bei den ersten chiralen stationären Phasen (N-TFA-Aminosäureester) nur zwei Wasserstoffbrücken möglich waren, wurde die bessere Trennleistung der Dipeptide und Aminosäuren durch drei mögliche Wasserstoffbrücken erklärt[19,20]. Bei der chiralen Polysiloxanphase wird ein diastereomerer Assoziationskomplex in einer Faltblattstruktur ähnlich wie bei β-Keratin diskutiert[21]. In einer ganzen Reihe von Arbeiten waren es besonders Parr und Howard[19,20,22-25] und Carbin et al.[26], die die Einflüsse der verschiedenen Reste von Dipeptidphasen untersuchten.

Für die gaschromatographische Analyse der chiralen Verbindungen ist in den meisten Fällen eine Derivatisierung notwendig. Diese ist meist sehr zeitaufwendig und oft müssen aggressive und toxische Reagenzien verwendet werden. Dies ist wohl auch ein Grund, daß die gaschromatographische Trennung enantiomerer Verbindungen nur selten im Routinebetrieb durchgeführt wird. Allgemein gilt dies natürlich auch für alle Verbindungen, die erst nach einer Derivatisierung gaschromatographisch analysiert werden können.

B. ALLGEMEINER TEIL

1. Die gaschromatographische Trennung der 2-Hydroxycarbonsäuren in ihre optischen Antipoden

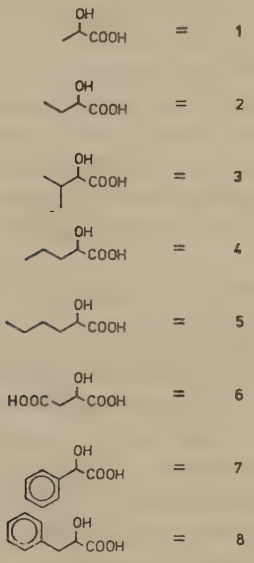
1.1. Einleitung

Die Trennung der optischen Antipoden der 2-Hydroxycarbonsäuren ist in der Biochemie und in der Medizin von großem Interesse[27]. So können z.B. beide Enantiomeren der Milchsäure in biologischen Proben gefunden werden[28].

Ein Weg, die Enantiomeren der 2-Hydroxycarbonsäuren gaschromatographisch zu trennen, ist die Umsetzung in diastereomere Ester mit chiralen Alkoholen wie z.B. R- oder S-Butan-2-ol[29,30], oder aber die Derivatisierung der Hydroxylgruppe mit chiralen Reagenzien wie z.B. Methylchlorformiat[31] oder chiralen Isocyanaten[32]. Die Bildung solcher diastereomerer Derivate und deren anschließende Trennung auf achiralen Säulen ist bekanntlicherweise mit einigen wesentlichen Nachteilen verbunden, so z.B. der Notwendigkeit mit optisch hochreinen Reagenzien arbeiten zu müssen, die, wenn in dieser Form überhaupt erhältlich, sehr teuer sind.

Die direkte Trennung der Enantiomeren von 2-Hydroxycarbonsäuren an chiralen Phasen wurde erstmals 1978 berichtet[33]. Sie gelang an Chirasil-Val als 2-Pentafluorpropionoxy-N-cyclohexylcarbonsäureamide. Die Einführung der NH-Gruppe durch Amidierung war wesentlich für die gute chirale Erkennung. So wurden z.B. die entsprechenden Ester nicht in die optischen Antipoden getrennt. Die Einführung einer NH-Gruppe ist aber auch durch Derivatisierung der Hydroxylgruppe zum Urethan möglich. Dadurch gelang auch die Trennung chiraler Alkohole[34]. Es wurden folgende stickstoffhaltige Derivate für die Trennung der 2-Hydroxy-

carbonsäureenantiomeren getestet: die 2-Carbamoyloxy-carbonsäureester[35], die 2-Trimethylsiloxycarboxamide und die 2-Heptafluorbutyryloxycarboxamide[36]. Die 2-Carbamoyloxycarbonsäureester wurden später ausführlich noch von anderen Autoren veröffentlicht[37,38]. Da auch die freie Hydroxylgruppe starke Wasserstoffbrücken bilden kann, wurden die 2-Hydroxycarbonsäureester[35,36,39,42] mit in die Untersuchungen einbezogen, sowie die 2-Carbamoyloxycarboxamide[40]. Jedes dieser Derivate hat seine Vor- aber auch seine Nachteile, die aufgezeigt werden sollen. Bei all diesen Derivaten scheinen Wasserstoffbrückenbindungen die wesentliche Rolle für die gute chirale Erkennung zu spielen.



Schema 1: Die im Testgemisch enthaltenen 2-Hydroxycarbonsäuren

1.2. Die Derivate der Hydroxycarbonsäuren

Für einen Vergleich der verschiedenen Derivate wurden folgende 2-Hydroxycarbonsäuren gewählt: Milchsäure (1), 2-Hydroxybuttersäure (2), 2-Hydroxyisovaleriansäure (3), 2-Hydroxyvaleriansäure (4), 2-Hydroxyhexansäure (5), Äpfelsäure (6), Mandelsäure (7) und β-Phenylmilchsäure (8) (Schema 1).

1.2.1. Die Perfluoracyloxycarbonsäureamide

Die Derivate, die zuerst zur Trennung enantiomerer 2-Hydroxycarbonsäuren an chiralen Phasen benutzt wurden, waren die 2-Perfluoracyloxycarboxamide. Ihre Darstellung erfolge in einer 3-stufigen Derivatisierung (Schema 2).

$$\text{H-OCHRCO-OH} + \text{R'OH} \xrightarrow{H^+} \text{H-OCHRCO-OR'} + H_2O$$

$$\text{H-OCHRCO-OR'} + \text{R''NH}_2 \longrightarrow \text{H-OCHRCO-NHR''} + \text{ROH}$$

$$\text{H-OCHRCO-NHR''} + (C_3F_7CO)_2O \longrightarrow C_3F_7CO\text{-OCHRCO-NHR''} + C_3F_7COOH$$

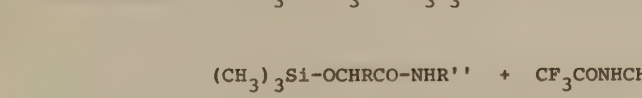
Die Methylierung mit Diazomethan ist nicht immer vollständig oder führt zu Nebenprodukten. So enthalten Proben oft Hydroxycarbonsäuren in Form von intermolekularen Lactiden, die allerdings beim zweiten Derivatisierungsschritt analog wie die Methylester in die gleichen Amide überführt werden. Zum anderen beobachtet man bei der Umsetzung mit Diazomethan zum Teil eine Methylierung der Hydroxylgruppe. Der zweite Derivatisierungsschritt, die Aminolyse, muß bei hohen Temperaturen stattfinden, um befriedigende Reaktionszeiten zu erzielen. Hierbei ist aber die Racemisierung der Mandelsäure und ihrer Analoga groß, bedingt durch den Mesomerieeffekt des Phenylrings,

der das Carbanion, das als Zwischenprodukt während der Racemisierung entsteht, stabilisiert. So ist bei den gewählten Bedingungen 27 % L-Mandelsäure in den optischen Antipoden invertiert. Bei den aliphatischen Hydroxycarbonsäuren beträgt die Racemisierung nur 1-2 % unter den gleichen Bedingungen. Im letzten Derivatisierungsschritt werden die 2-Hydroxycarbonsäureamide in 2-Heptafluorbutyroxycarbonsäureamide überführt. Dies geschieht durch Erhitzen mit dem entsprechenden Anhydrid der Perfluorcarbonsäure. Ein Chromatogramm der Standardmischung zeigt Abbildung 1.

Diese Derivate haben akzeptable gaschromatographische Eigenschaften. Die Substanzen eluieren in einem fast symmetrischen Profil und alle Enantiomeren werden sehr gut getrennt. Die Trifluoracetoxy- und Pentafluorpropionoxyderivate sind empfindlicher gegen Hydrolyse und sind deshalb weniger geeignet. Aus diesem Grund muß die Kapillare gut desaktiviert sein, so daß die Glasoberfläche keine basischen und nucleophilen Zentren hat[48]. Die Derivate sind nicht über mehrere Tage haltbar.

1.2.2. Die Trimethylsiloxycarbonsäureamide

Ist der dritte Derivatisierungsschritt eine Trimethylsilylierung der Hydroxylgruppe, die sehr schonend und schnell abläuft, erhält man die 2-Trimethylsiloxycarboxamide (Schema 3).



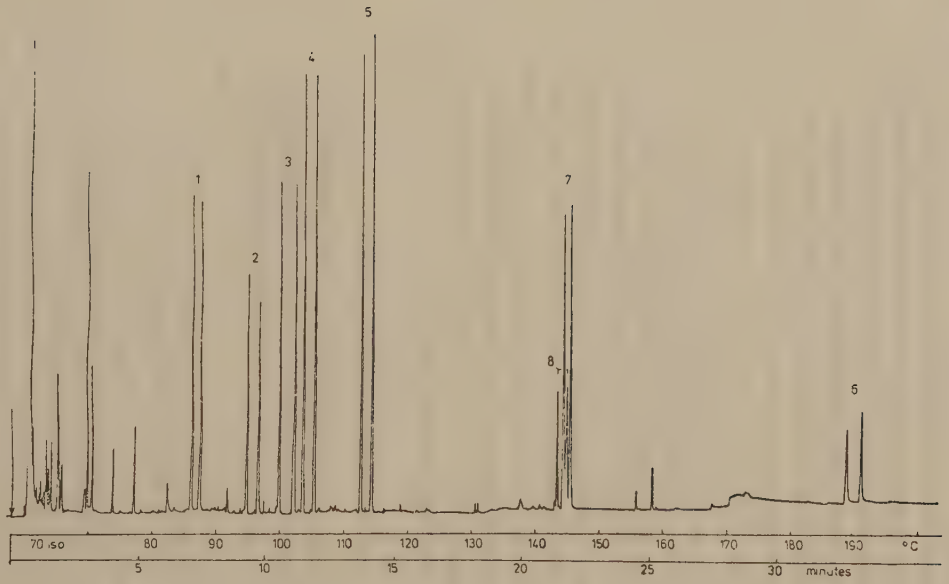


Abb. 1: Chromatogramm der 2-Heptafluorbutyroxycarbonsäure-n-propyl-amide. Säule: Quarzkapillare belegt mit Chirasil-Val,Nr. 575

Diese Derivate sind den vorher beschriebenen vorzuziehen. Ein Chromatogramm der Testmischung ist in Abbildung 2 wiedergegeben.

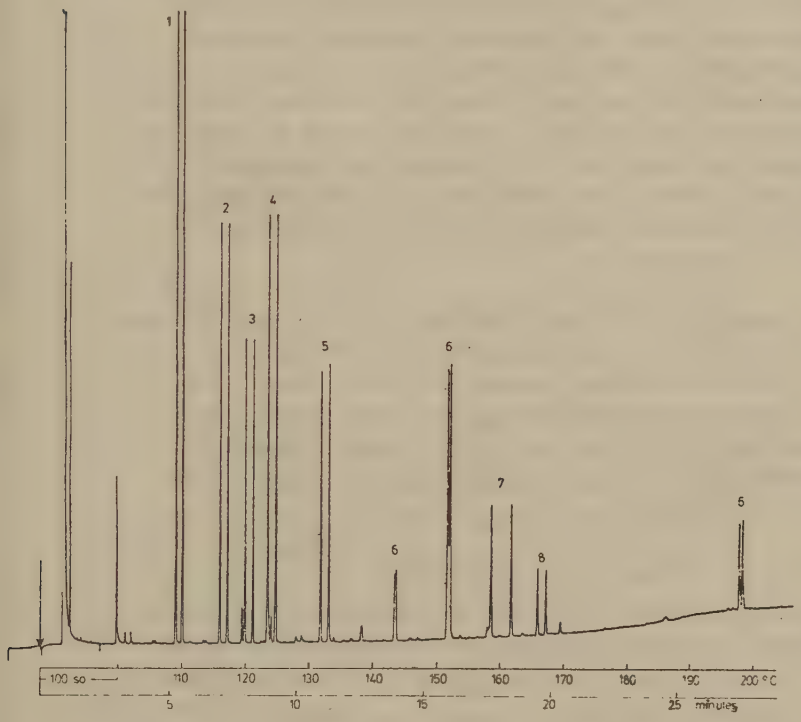


Abb. 2: Chromatogramm der 2-Trimethylsiloxycarbonsäure-n-propylamide. Säule: Quarzkapillare belegt mit Chirasil-Val, Nr. 575

Die Auflösung der Enantiomeren ist nur unwesentlich kleiner, was auch auf die höhere Elutionstemperatur zurückzuführen ist, da die Stabilität eines Assoziationskomplexes mit steigender Temperatur abnimmt[25]. Äpfelsäure bildet durch unvollständige Aminolyse drei Enantiomerenpaare: Werden beide Estergruppen umgesetzt, bilden sich die Diamide, die bei 197°C eluieren. Wird nur eine Estergruppe umgesetzt, entstehen sowohl die Amide in α-Stellung sowie die in β-Stellung zum chiralen Zentrum, je nachdem welche der beiden Estergruppen umgesetzt wird. Diese beiden Enantiomerenpaare werden bei 143°C bzw. 152°C eluiert.

Die Stabilität der 2-Trimethylsiloxycarbonsäureamide gegenüber Hydrolyse ist bedeutend größer, als die der entsprechenden Perfluoracylsäureamide. Die Derivate können über längere Zeit aufbewahrt werden, ohne daß Zersetzung beobachtet werden kann. Auch an die Desaktivierung des chromatographischen Systems werden keine besonderen Anforderungen gestellt.

1.2.3. Die Carbamoyloxycarbonsäureester

Da die Enantiomeren von chiralen Alkoholen als Carbamate getrennt werden konnten[34], wurden die analogen Derivate der 2-Hydroxycarbonsäuren dargestellt und getestet[35].

Die 2-Hydroxycarbonsäuren werden zuerst verestert und dann mit Isocyanat behandelt, um sie in die entsprechenden Carbamoyloxyderivate zu überführen (Schema 4).

Weil die Reaktionsgeschwindigkeit sehr gering ist[32], muß eine Base zugesetzt werden, um hohe Ausbeuten zu erzielen. Dies wird in Abbildung 3 deutlich. Ohne Basenzusatz ist die Reaktion selbst nach 3 Stunden nicht beendet. Setzt

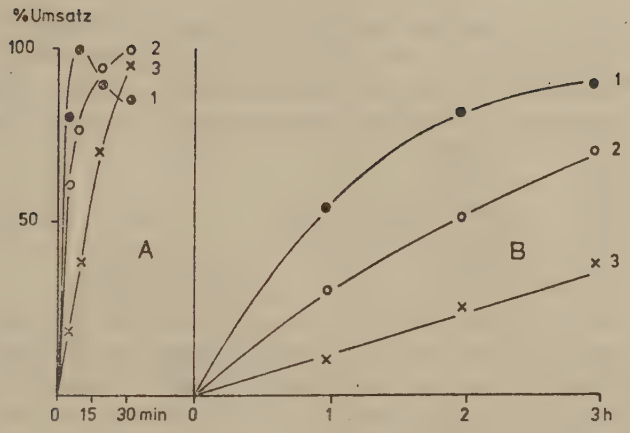


Abb. 3: Umsetzung der 2-Hydroxysäuremethylester in die 2-Isopropylcarbamoyloxycarbonsäuremethylester durch Behandlung mit Isopropylisocyanat in (A) Triethylamin und (B) Methylenchlorid jeweils 50 %ig bei 110°C

man Triethylamin zu, erhält man schon nach 10 Minuten gute Ausbeuten. Ein Chromatogramm der Testmischung ist in Abbildung 4 zu sehen.

Die guten gaschromatographischen Eigenschaften und die zweistufige Darstellung sind wesentliche Vorteile dieser Derivatisierung. Auch zeigen alle Hydroxycarbonsäuren, einschließlich Äpfelsäure, sehr hohe Auflösungen in die optischen Antipoden. Ein weiterer Vorteil ist die Bildung von nur einem Derivat der Dicarbonsäuren. Hinzu kommt die zu vernachlässigende Racemisierung vor allem auch bei der Mandelsäure während der Derivatisierung.

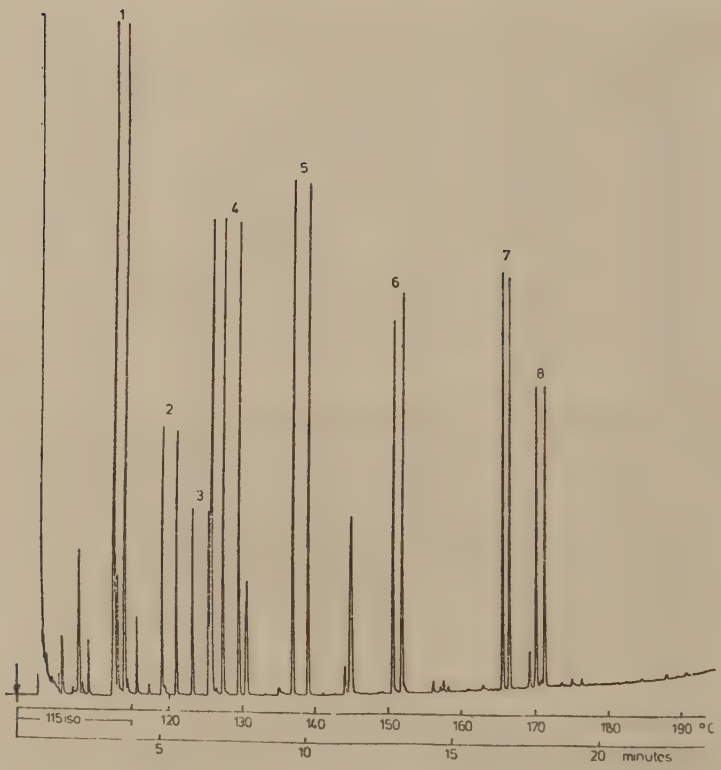


Abb. 4: Chromatogramm der 2-Carbamoyloxycarbonsäureester. Säule: Quarzkapillare belegt mit Chirasil-Val, Nr. 575

Ein wesentlicher Nachteil ist die Bildung zahlreicher Nebenprodukte, die mit den interessanten Peaks überlappen können. Durch Verwendung von frisch destilliertem Isocyanat und Base wird die Bildung der Nebenprodukte auf einem Minimum gehalten.

1.2.4. Die Carbamoyloxycarbonsäureamide

Eine weitere Möglichkeit zur Derivatisierung der 2-Hydroxycarbonsäuren ist die direkte Umsetzung zu den 2-Carbamoyloxycarboxyamiden durch Erhitzen mit Isocyanat[40], eine einstufige Derivatisierung mit vernachlässigbarer Racemisierung (Schema 5).

$$H\text{-}OCHCO\text{-}OH + 2R''NCO \longrightarrow R''NHCO\text{-}OCHRCO\text{-}NHR'' + CO_2$$

Die Nachteile dieser Reaktion sind allerdings groß (Abbildung 5). Die Reaktionsgeschwindigkeit ist sehr langsam. Nach einer Stunde beträgt die Ausbeute nur ca. 20 %. Die Auflösung in die optischen Antipoden ist sehr klein und die Derivate sind relativ schwer flüchtig. Bedingt durch die lange Reaktionszeit werden erhebliche Anteile von Nebenprodukten gebildet.

1.2.5. Die Hydroxycarbonsäureester

Die gaschromatographische Trennung enantiomerer 2-Hydroxycarbonsäureester ist eine weitere Möglichkeit, die vorgestellt wurde[39]. Mit nicht desaktivierten Glaskapillaren erhielt man allerdings ein stark asymmetrisches Elutionsprofil[35]. Quarzkapillaren sind für die Trennung dieser Derivate besser geeignet (Abbildung 6)[42].

Allerdings treten auch an Quarz unterschiedliche Adsorptionseffekte auf, die zu vernachlässigen sind, wenn die Derivate in hoher Konzentration vorliegen. Arbeitet man in Konzentrationsbereichen, die in der Nähe der Nachweisgrenze liegen, wird der Fehler erheblich. Gibt man zu einer Probe eines α-Hydroxycarbonsäuremethylesters eine Aliquot eines n-Alkans und verdünnt die Probe nach jeder Analyse, sollte sich das Verhältnis Probe zu n-Alkan nicht verändern[49].

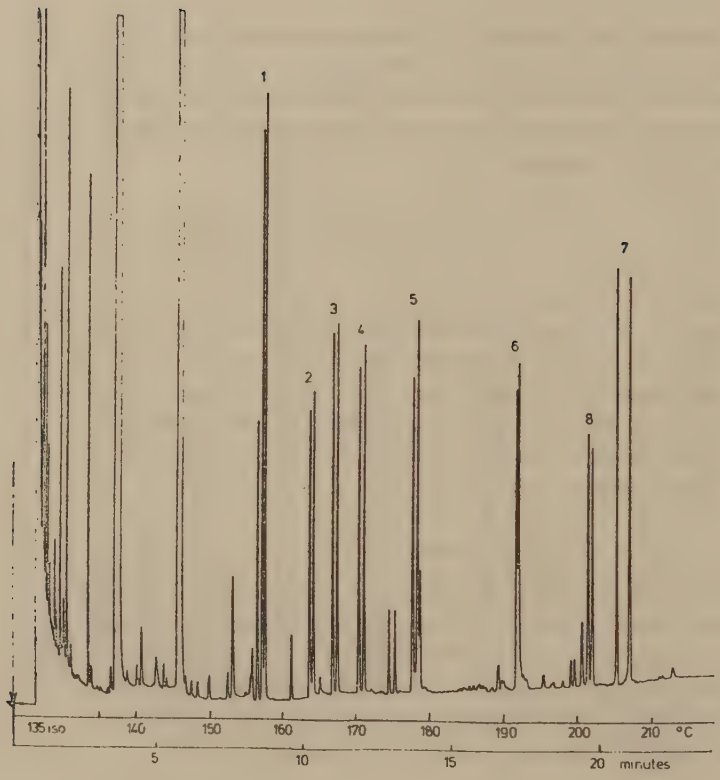


Abb. 5: Chromatogramm der 2-Carbamoyloxycarbonsäureamide. Säule: Quarzkapillare belegt mit Chirasil-Val, Nr. 575

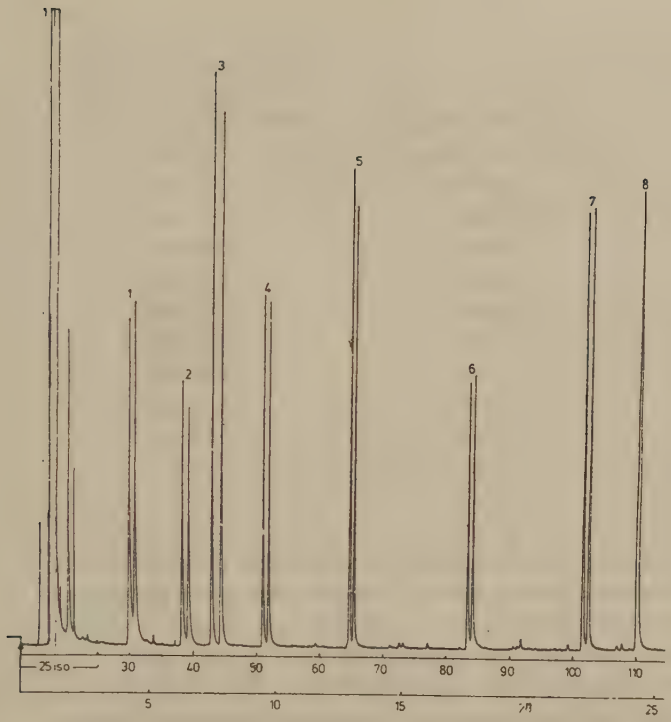


Abb. 6: Chromatogramm der 2-Hydroxycarbonsäureester. Säule: Quarzkapillare belegt mit Chirasil-Val, Nr. 575

Treten allerdings zwischen Probe und chromatographischem System Adsorptionseffekte auf, wird sich das Verhältnis zu Gunsten des n-Alkans ändern, da die Kohlenwasserstoffe nicht adsorbiert werden. Je nach Stärke der Effekte, vor allem aber wenn diese irreversibel sind, wird sich das Verhältnis bei unterschiedlich kleinen Konzentrationen unterschiedlich stark verschieben.

Tab. 1:

Fläche C_{14}	Hydroxysäure/C_{14}	Menge auf der Säule
668.560	2.578	1000 ngr
425.328	2.625	750 ngr
17.056	2.603	100 ngr
20.314	2.598	100 ngr
3.636	2.546	10 ngr
0.340	2.253	1 ngr
0.167	2.189	800 pgr
0.101	1.663	500 pgr
0.062	1.387	250 pgr

Sind die Wechselwirkungen zwischen Probe und chromatographischem System sehr stark, muß man selbst bei hohen Konzentrationen diesen Fehler berücksichtigen. In Tabelle 1 ist zu erkennen, daß ab einer Verdünnung von 1:1000 dieser Fehler zu berücksichtigen ist und bei einer Verdünnung von 0.025 %, man arbeitet hier mit einem Peak/Rauschverhältnis von 5:1, schon 50 % ausmacht (s. auch Abbildung 7).

Diese Untersuchungen wurden an einer Quarzkapillare durchgeführt, die mit Chirasil-Val belegt war. Eine Desaktivierung des Verdampfereinsatzes durch Persilylierung konnte diesen Fehler nicht verkleinern. Ein Weg hierzu wäre in einer Desaktivierung der Quarzoberfläche zu suchen[50,51].

Neben der Diskriminierung durch Adsorption ist ein weiterer Nachteil dieser Derivatisierung, daß in unserem Testgemisch die Enantiomeren der β-Phenylmilchsäure nicht

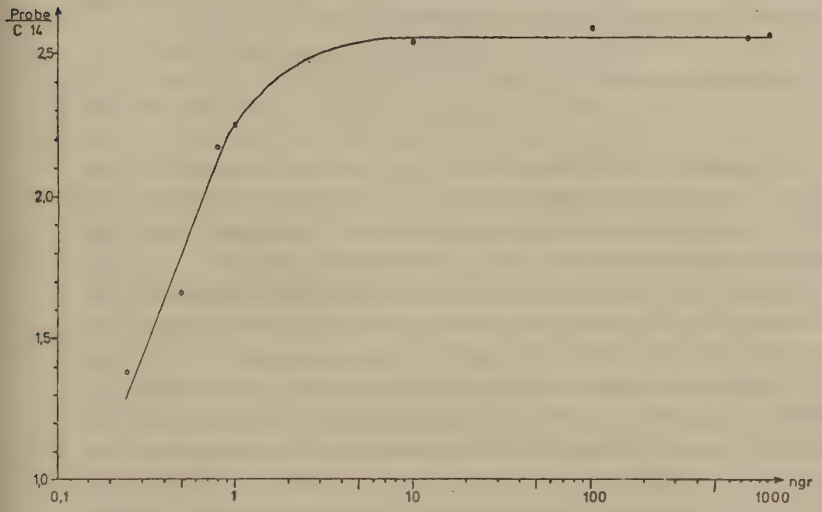


Abb. 7: Aktivität einer Quarzsäule belegt mit Chirasil-Val (Nr. 575) gegenüber α-Hydroxyhexansäure-methylester. Es wurde das Flächenverhältnis des Hydroxysäureesters zu einem internen Standard gegen die Probenmenge auf der Säule aufgetragen

getrennt werden. Bei niedrigerer Temperatur ist zwar eine Trennung möglich, doch die Analysenzeit beträgt dann über zwei Stunden. Die Racemisierung während der Derivatisierung ist zu vernachlässigen. Die Reaktion verläuft annähernd quantitativ. Da die Derivate sehr flüchtig sind, kann es vor allem bei den niedermolekularen Homologen zu Verlusten während des Abblasens des überschüssigen Reagenzes kommen. Die Methylierung der Carboxylgruppe mit Diazomethan ist eine rasche und

schonende Methode der Veresterung, führt aber auch in geringem Maß zur Methylierung der Hydroxylgruppe. Das Reagenz in etherischer Lösung ist hochflüchtig und läßt sich ohne nennenswerte Verluste von z.B. Milchsäuremethylester unter einem leichten Stickstoffstrom entfernen.

Die Veresterung durch Alkoholyse unter saurer Katalyse zeigt die o.g. Nebenprodukte nicht[42], erfordert aber beim Entfernen des Reagenzes einen erheblichen Zeitaufwand. Bei Darstellung der Methylester durch eine Lösung von 5 N Chlorwasserstoff in Methanol ist das Abblasen des Reagenzes nicht ohne erhebliche Verluste der niedermolekularen Homologen möglich. Vor allem durch die Bildung von schwerflüchtigen Alkoxoniumchloriden wird der Vorgang zusätzlich erschwert. Die höheren Homologen der Alkohole, deren Hydroxysäureester schwerer flüchtig sind, lassen sich besser abtrennen[42]. Für die Lebensdauer der Phase Chirasil-Val ist ein vollständiges Entfernen des Chlorwasserstoffs wichtig. Eine wenn auch aufwendige Möglichkeit bildet die "Neutralisation" durch Zugabe des dem Alkohol entsprechenden Diazoalkans. Die schnelle Reaktion mit Chlorwasserstoff zum Alkylchlorid und das sofortige Entfernen des überschüssigen leicht flüchtigen Diazoalkans, vereint die Vorteile der katalytischen Veresterung durch Alkohole mit denen der Veresterung mit Diazoalkanen: Keine Bildung von Nebenprodukten, keine Verluste von niedermolekularen Hydroxysäuren und eine Probe, die ohne vollständiges Entfernen des Reagenzes chromatographiert werden kann. Diese Möglichkeit ist allerdings auf die Veresterung mit primären Alkoholen beschränkt. Die Methode der Veresterung mit Diazoalkanen ist dann zu wählen, wenn nur freie Hydroxycarbonsäuren analysiert werden sollen, deren Anhydride bzw. intermolekulare Lactide dabei aber nicht erfaßt werden sollen.

Andere Möglichkeiten der Veresterung sind in der pyrolytischen Veresterung im heißen Einspritzblock mit Tetra-

methylammoniumsalz[43] und in der Veresterung mit Acetalen[44] zu sehen.

1.2.6. Vor- und Nachteile der Derivate

Für den Anwender stellt sich nun die Frage, welche Derivatisierung für eine bestimmte Probe geeignet ist. Die Wahl wird durch mehrere Faktoren bestimmt: die Zusammensetzung der Probe, das Verhältnis der zu bestimmenden optischen Antipoden und die zu bestimmenden Hydroxycarbonsäuren. Normalerweise ist die schnellste und einfachste Analytik zu bevorzugen. Hier zeigen die Hydroxycarbonsäureester deutliche Vorteile, wenn das Abtrennen des aggressiven Reagenzes unproblematisch ist, wie z.B. bei den höheren Homologen der Hydroxycarbonsäuren oder wenn die Verwendung von Diazoalkanen möglich ist. Werden allerdings nur geringe Probenmengen auf die Kapillarsäule gebracht, sind selbst bei Quarzkapillaren Adsorptionseffekte möglich. Können nur Mengen unter 1 ngr auf die Säule gebracht werden, sollten nur gut desaktivierte Kapillarsäulen verwendet werden, die bezüglich ihrer Diskriminierung der Hydroxycarbonsäureester getestet worden sind. Da die Enantiomeren der β-Phenylmilchsäure nicht getrennt werden, ist hier die weitere Derivatisierung zu den Carbamoyloxyderivaten oder die Darstellung der Trimethylsiloxycarbonsäureamide notwendig. Hydroxysäuren mit zwei Carboxylgruppen sollen entweder verestert oder weiter zu den Carbamoyloxyderivaten umgesetzt werden. Weinsäure allerdings ist problematischer. Veresterung mit Diazoalkanen führt in größerem Ausmaß zur Methylierung einer Hydroxylgruppe. Die Veresterung mit Alkoholen unter saurer Katalyse ist hier vorzuziehen. Die zwei benachbarten Hydroxylgruppen bewirken selbst auf gut desaktivierten Säulen stark unsymmetrische Elutionsprofile. Die Reaktion mit Isopropylisocyanat führt zu den Biscarbamoyloxyderivaten, die bei höherer Temperatur

in die Enantiomeren getrennt werden. Mit tert.-Butylisocyanat und geringerer Konzentration an Triethylamin (ca. 20 %) entsteht das flüchtigere Monourethan als Hauptprodukt, das ebenfalls gute Auflösung der optischen Antipoden zeigt. Die Symmetrie der meso-Weinsäure wird aufgehoben und es entstehen zwei Enantiomere, die ebenfalls aufgetrennt werden[35]. Mandelsäure und ihre Analoga können als 2-Hydroxycarbonsäureester oder als 2-Carbamoyloxycarbonsäureester analysiert werden. Für aliphatische Hydroxycarbonsäuren eignen sich die 2-Trimethylsiloxycarbonsäureamide wegen ihrer guten gaschromatographischen Eigenschaften und ihrer Stabilität. Kann die Derivatisierung im Automaten durchgeführt werden, ist auch die dreistufige Umsetzung kein Nachteil. Perfluoracyloxy- und Carbamoyloxycarbonsäureamide sind kaum anwendbar. Erstere sind den analogen Trimethylsiloxyderivaten wegen ihrer Unbeständigkeit unterlegen, letztere haben kleine Trennfaktoren der Enantiomeren, bilden eine Anzahl Nebenprodukte und eluieren erst bei sehr hohen Temperaturen.

2. BETRACHTUNG ÜBER DAS CHIRALE ERKENNEN OPTISCH AKTIVER PHASEN

2.1. Einleitung

Da enantiomere Hydroxycarbonsäuren in Form verschiedener Derivate auf Chirasil-Val getrennt werden können, bietet sich die Möglichkeit an, über strukturelle Voraussetzungen der Trennung an optisch aktiven Phasen systematische Untersuchungen durchzuführen. Die Bildung von diastereotropen Assoziationen mit der Phase, durch die eine Trennung der Enantiomeren bewirkt wird, erfolgt im wesentlichen durch Wasserstoffbrückenbindungen[18,21,22,40,45]. W. König stellte diese Theorie zwar in Frage[52,53], wurde allerdings in weiteren Untersuchungen durch ^{13}C-NMR[55], durch Vergleiche mit IR-Messungen von Diamiden verschiedener Peptide[56,57] und Aufstellung eines Modells zur Trennung von Diestern an Chirasil-Val[58] widerlegt. In dieser Arbeit wird nun untersucht, in welchen Positionen, relativ zum chiralen Zentrum, Wasserstoffbrückenakzeptoren bzw. -donoren zu einer chiralen Erkennung führen oder aber diese behindern.

Die ersten Arbeiten über strukturelle Voraussetzungen für die Trennung von Enantiomeren an chiralen Phasen, beschäftigten sich vor allem mit dem Einfluß verschiedener Substituenten am chiralen Zentrum der Phase. Es stellte sich u.a. heraus, daß vor allem Valinderivate als aktives Strukturelement chiraler Phasen die Enantiomeren von Aminosäuren besonders gut trennten[45,18]. Systematische Untersuchungen über den Einfluß der Substituenten am chiralen Zentrum der zu trennenden Aminosäuren folgten[59]. Daneben wurde mit unterschiedlichem Erfolg versucht, chirale Amine[22,54,57,59-61], β- und γ-Aminosäuren[22,56,59] und Aminoalkohol[22,56,57,61] an chiralen Phasen in die Enantiomeren zu trennen. Hieraus wurden Theorien über die

chirale Erkennung durch diese Phasen entwickelt[22,45,56-58]. Die Trennfaktoren können aber durch mehrere Einflüsse bestimmt sein. Es ist mit Risiken behaftet, unterschiedliche Substanzgruppen miteinander zu vergleichen und daraus Modelle abzuleiten, die für die einzelnen Moleküle nur je einen Assoziationskomplex postulieren, der zur Trennung der Enantiomeren führt. Dies ist besonders dann unwahrscheinlich, wenn die Verbindung mehrere Wasserstoffbrückenbindungen bilden kann. So ist es z.B. nicht einsichtig, daß das Assoziat, das zur chiralen Erkennung der α-Hydroxycarbonsäureester führt, mit dem Phenylmilchsäuremethylester, dessen Enantiomeren kaum getrennt werden, nicht ausgebildet wird. Aus der nicht erfolgten Auflösung kann also nicht der Schluß gezogen werden, daß die Verbindung kein Strukturelement aufweist, mit dem ein diastereotropes Assoziat möglich ist. Wird dies trotzdem getan, kann das leicht zu falschen Schlußfolgerungen führen[22], die dann durch neue Kenntnisse widerlegt werden[56].

Im folgenden wird das Molekül deshalb nicht mehr einfach als Ganzes betrachtet, mit dem dann ein Assoziat postuliert wird. Es wird als Kombination von Wasserstoffbrückenbildnern gesehen, die in einer bestimmten Position zum chiralen Zentrum stehen. Von diesen bilden je zwei ein Inkrement. Das Molekül ist eine Kombination von Inkrementen, die mit der Phase in Wechselwirkung treten können.

2.2. Bestimmung thermodynamischer Parameter

Die Auflösung in die optischen Antipoden ist ein direktes Maß für den Unterschied ihrer freien Enthalpiedifferenzen zwischen der Lösung (Phase) und der Gasphase

$$\Delta\Delta G_o = - RT \ln t_{SL} / t_{SD}$$

wobei t_{SL} und t_{SD} die Nettoretentionszeiten des L- und D-Antipoden sind und vertauscht werden können, da

$$\alpha = \frac{t_{SL}}{t_{SD}} \geq 1$$

definiert ist. Mit

$$\Delta G_o = \Delta H_o - T \Delta S_o$$

ergibt sich

$$\ln \alpha = - \frac{\Delta\Delta H_o}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta\Delta S_o}{R}$$

In einer Abbildung von ln α in Abhängigkeit von $\frac{1}{T}$ ist also die Steigung der Geraden ein Maß für den Enthalpieunterschied und der Achsenabschnitt ein Maß für den Entropieunterschied zwischen der Löslichkeit der beiden Antipoden in der Phase, wenn man diese Werte mit R multipliziert.

Auf diese Art werden die Lösungsenthalpiedifferenzen der verschiedenen Derivate der Hydroxycarbonsäureester mit Chirasil-Val gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Im Anhang sind die graphischen Darstellungen der linearen Regressionen von ln α und $\frac{1}{T}$ dargestellt.

Ebenso wurden die Enthalpiedifferenzen der N,O,S-PFP-Aminosäuren-n-propylester auf Chirasil-Val bestimmt. Auch dazu ist in Anhang die graphische Darstellung der linearen Regression von ln α und $\frac{1}{T}$ enthalten (Tabelle 3).

Außerdem wurden von einigen Substanzen, die sich auf Chirasil-Val in ihre Enantiomeren trennen ließen, die Enthalpiedifferenzen bestimmt. Sie sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tab. 2: Enthalpiedifferenzen der α-Hydroxycarbonsäuren, $-\Delta\Delta H$[cal x Mol^{-1}]

Carbonsäure: Derivat der Hydroxyl- Gruppe	Carboxyl-	Milch-säure	1-Hydroxy-butter-säure	1-Hydroxy-Isovalerian-säure	1-Hydroxy-valerian-säure	1-Hydroxy-Hexansäure	Äpfel-säure	Mandel-säure
underivatisiert	Methylester	258	218	290	143	125	134	237
Isopropyl-urethan	Methylester	554	589	667	577	588	357	351
TMS	n-Propylamid	186	197	225	194	189	96	513
Isopropyl-urethan	Isopropyl-amid	60[2]	53[2]	78[2]	63[2]	166[2]	74[2]	747
HFB	n-Propylamid	159	259	411	301	322	[1]	282

Die Werte wurden aus den α-Werten bei fünf bis sechs verschiedenen Temperaturen ermittelt (Säule 575).

1) Wurde bei 110°C nicht acyliert.

2) Die Werte sind mit einem großen Fehler behaftet, da kein eindeutiger Kurvenverlauf festgestellt wird.

Tab. 3: Enthalpiedifferenz der Aminosäureenantiomeren auf Chirasil-Val (Säule 575), $-\Delta\Delta H$[cal x Mol^{-1}]

Die Werte wurden aus den α-Werten bei sechs verschiedenen Temperaturen ermittelt.

Aminosäure	Ala	Val	Thr	alo-Ile	Ile	Pro	Leu	Ser
$-\Delta\Delta H$	443	391	296	381	351	30	743	171

Aminosäure	Cys	Asp	Met	Phe	Glu	Tyr	OMe	Lys
$-\Delta\Delta H$	232	105	381	330	342	304	350	302

Aminosäure	Trp	Arg
$-\Delta\Delta H$	179	234

Tab. 4: Enthalpiedifferenzen von Enantiomeren auf Chirasil-Val $-\Delta\Delta H$ [cal x Mol^{-1}]

Substanz	Derivat	$-\Delta\Delta H$
2-Amino[56,60]		
1-Phenyl	N,O-TFA	13
Ethanol	O-TMS, N-TFA	43
2-Amino[57,60]	TFA	26
Oktan	N-Acetyl	34
	Urethan	95
Pentanol-(2)[60,63]	Urethan	29
2-Phenylpropionsäure	n-Propylamid	101
	Anilid	141
α-Phenylethanol[60]	-	56

2.3.1. Die Darstellung von Selektor (Phase) und Substrat

Alle bisher aufgestellten Theorien zur chiralen Erkennung wurden entwickelt, indem komplexe Moleküle als ganzes betrachtet wurden. Es wurden sterische Einflüße auf die Wechselwirkung mit der Phase untersucht, indem Substituenten am oder in der Nähe des chiralen Zentrums variiert worden sind. Hieraus wurden Schlüsse gezogen, wie das Molekül während des chiralen Erkennens im Komplex assoziert sein muß. So wurde durch Variationen der Substituenten am chiralen Zentrum der Phase festgestellt, daß bei einer Phase, die eine Aminosäure als Grundbaustein besitzt, die C-terminale Seite als Amid vorliegen sollte, wobei der Amidrest einen wesentlichen Einfluß auf das chirale Erkennen von Aminosäuren hat. Der an der N-terminalen Seite amidartig ausgebildete Carbonsäurerest spielt eine wesentlich geringere Rolle[45,62]. Die Folge dieser Erkenntnis war, daß Phasen synthetisiert worden sind, bei denen der N-terminale Rest zur thermischen Stabilisierung, der C-terminale zur chiralen Erkennung optimiert wurde. Für diese Untersuchung ist eine leicht synthetisierbare Phase, deren Struktur genau bekannt ist, gut geeignet. So wurde z.B. von Gil-Av eine Vielzahl verschiedener Phasen und deren Wechselwirkung mit chiralen Substanzen untersucht. Als Phasen wurden z.B. leicht synthetisierbare Aminosäurederivate, Peptide, Amide oder Ureide benutzt[74]. Ist das Peptid oder die Aminosäure N-terminal an ein Silikon gebunden, verursacht dies die hervorragende thermische Stabilität von Chirasil-Val[75]. Die Synthese der Phasen für solche Untersuchungen war aber zeitaufwendiger[60]. Wegen des großen Temperaturbereichs, in dem mit Chirasil-Val gearbeitet werden kann, ist diese Phase für Untersuchungen auf der Substratseite bestens beeignet. So kann mit einer Kapillarsäule belegt mit Chirasil-Val in einem Temperaturbereich von 20-240^{o}C gearbeitet werden. Sämtliche thermodynamischen Parameter können daher an dieser

einen Phase, also gegenüber eines Selektors, bestimmt werden. Aus diesem Grund wird im folgenden diese Seite des Assoziationskomplexes als konstant angesehen. Das an der Phase getrennte Molekül wird in Inkremente von je zwei Wasserstoffbrückenbildnern (Donoren bzw. Akzeptoren) zerlegt, die durch ihre Stellung zum chiralen Zentrum definiert sind. Denn einerseits müssen mindestens zwei dieser aktiven Zentren vorhanden sein, um ein chirales Erkennen zu ermöglichen; zum anderen können durch Kombination der Inkremente auch Assoziate mit mehr als zwei Wasserstoffbrückenbindungen dargestellt werden.

Da zur Vereinfachung die Betrachtung des Selektors, also der Phase, entfallen soll, müssen die Inkremente in einer Konformation betrachtet werden, in der sie zu vergleichen sind, d.h. die Darstellung muß sowohl für alle Inkremente eindeutig definiert sein, als auch durch den Selektor diktiert werden. Die Fixierung an den Selektor erfolgt durch die zwei Wasserstoffbrückenbildner. In dieser Arbeit werden Inkremente mit je einem Wasserstoffbrückendonor und einem Akzeptor untersucht. Es werden die Donoren in vergleichbarer Konformation geschrieben. Donor, Akzeptor und chirales Zentrum werden nun als lineare Kette dargestellt. Somit ergibt sich immer eine eindeutige Schreibweise der Inkremente, in der nun die Position des kleinen Wasserstoffs bzw. des voluminösen Rests am chiralen Zentrum verglichen werden kann.

2.3.2. Die Wasserstoffbrückenbildner des Substrats

Wesentliche Wasserstoffbrückenakzeptoren sind folgende Gruppen:

1) Die Carbonylgruppe der Carboxylgruppe und der Amidgruppe
2) Der zweibindige Sauerstoff im Urethan, im Ester und im TMS-Ether

3) Der Phenylring[76)]
4) Die Hydroxylgruppe
5) Der disubstituierte Amidstickstoff

Wasserstoffbrückendonoren sind im Wesentlichen:

1) N-H der Amidgruppe
2) Die Hydroxylgruppe

Die Stärke von solchen Wasserstoffbrückenbindungen wurde vor allem durch Infrarotspektroskopie[76-79)] bestimmt. Hierzu wurden vorwiegend Phenol oder Methanol, die starke Wasserstoffbrückendonoren sind, verwendet. Sie wurden in großer Verdünnung zu Wasserstoffbrückenakzeptoren gegeben. Durch Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung verschiebt sich die Streckschwingung der Hydroxylgruppe im IR-Spektrum. Diese Verschiebung ist direkt proportional zur Bindungsstärke. Mit Hilfe der in Tabelle 5 aufgeführten Frequenzverschiebungen ν_{OH} läßt sich eine grobe Einstufung der Akzeptoreigenschaften der hier vorhandenen Gruppen vornehmen.

Tab. 5: Frequenzverschiebungen der Streckschwingung von Hydroxylgruppen durch Wasserstoffbrückenbindungen $\Delta\nu$

Donor / Akzeptor	$\Delta\nu$ Phenol[79] $[cm^{-1}]$	$\Delta\nu$ Methanol[79] $[cm^{-1}]$	$\Delta\nu$ Methanol[78] $[cm^{-1}]$	$\Delta\nu$ Pentafluorphenol[78] $[cm^{-1}]$
Diethylether	276	152	139	285
Diphenylether	123	34	28	43
Di-tert. Butylether[77]		300		
Aceton	225	120		
Ethylacetat	179	85	102	199
Diethylurethan	270	140		
Benzol	55	30	28	49
Butanon			113	221
N-Methylformamid			122	271
N,N-Dimethylacetamid			203	356

2.3.3. Die Inkremente des Substrats

Da bisher immer nur dann eine hohe Auflösung der Enantiomeren festgestellt wurde, wenn sowohl mindestens ein Wasserstoffbrückenakzeptor wie ein Donor im Molekül vor-

handen war, sollen vor allem diese Inkremente betrachtet werden. In Abbildung 8 wird die NH-Gruppe immer auf die linke Seite gezeichnet. Der Wasserstoff zeigt nach unten. Die Substituenten am chiralen Zentrum sind immer so angeordnet, daß die Konfiguration abgebildet wird, die mit der Phase den stabileren, energieärmeren Komplex bildet.

Besitzt ein Molekül nur je einen Wasserstoffbrückendonor und Akzeptor, also nur ein Inkrement, wird es als "Stammkörper" betrachtet und die Lösungsenthalpiedifferenz zwischen dem R- und dem S-Antipoden wird diesem Inkrement zugeordnet. Es wird der Antipode dargestellt, der später eluiert wird.
Die $\Delta\Delta$H-Werte sind in Abbildung 9 ohne Klammern aufgeführt. Um vergleichbare Lösungsenthalpiedifferenzen der Inkremente zu erhalten, wurden als "Stammkörper" Substanzen mit einem linearen, unverzweigten Alkylrest am chiralen Zentrum gewählt. Bei einem unverzweigten Rest ändert sich die Enthalpiedifferenz bei Ketten mit zwei oder mehr Kohlenstoffatomen nur unwesentlich, d.h. der Einfluß einer unverzweigten Seitenkette ist nahezu unabhängig von dessen Größe.

Die Inkremente in Tabelle 8, deren Enthalpiedifferenzen in Klammern stehen, sind jeweils von dem darüberstehenden "Stammkörper" abgeleitet. Besitzt der Rest am chiralen Zentrum einen weiteren Wasserstoffbrückenakzeptor, kann ein weiteres Inkrement dargestellt werden. Der Akzeptor des "Stammkörpers" bildet nun den Rest des neuen Inkrements. Die Enthalpiedifferenzen in den Klammern sind die Differenzen dieser Werte zwischen dem Molekül, das zwei Inkremente beinhaltet, und dem "Stammkörper". Bei dieser Berechnung wird der sterischen Konfiguration des Restes soweit wie möglich Rechnung getragen. Das bedeutet, daß z.B. für die Mandelsäure der "Stammkörper" nicht mit

einem linearen Alkylrest definiert wird, sondern die Isovaleriansäure, die wie die Mandelsäure in α-Stellung verzweigt ist. Damit ergibt sich z.B. für Inkrement 6:

$$\Delta\Delta H_{\text{Mandelsäure}} - \Delta\Delta H_{\alpha\text{-Hydroxyisovaleriansäure}} =$$

$$-351 - (-667) = 316 \quad [\text{cal} \times \text{Mol}^{-1}]$$

Die chirale Erkennung zu Gunsten des S-Enantiomers wird also um diesen Wert verringert. In Tabelle 8 wird dies als ein positives chirales Erkennen (-310 [cal x Mol^{-1}]) für den optischen Antipoden dargestellt.

Manchmal muß allerdings die Enthalpiedifferenz des jeweiligen "Stammkörpers" abgeschätzt werden, was durch Inter- oder Extrapolation homologer Reihen möglich ist. Wird also durch das zweite Inkrement die chirale Erkennung verbessert, wird es in der Konfiguration des "Stammkörpers" dargestellt, bei Verschlechterung wird die Konfiguration des optischen Antipoden dargestellt. Somit kann angenommen werden, daß immer das Enantiomer abgebildet ist, das mit der Phase das stabilere Assoziat bildet. Die entsprechenden $\Delta\Delta H$-Werte können allerdings nicht ein Maß für die chirale Erkennung des Inkrements sein, sondern sollen nur eine grobe Abschätzung der Größenordnung dieser Werte ermöglichen. Diese wird bei der Diskussion der einzelnen Inkremente durchgeführt.

2.3.4. Diskussion der einzelnen Inkremente

Auffällig ist die bis auf eine Ausnahme konstante Konfiguration am asymmetrischen C-Atom.
Die Betrachtung der Ergebnisse im einzelnen: Bei den Inkrementen 1 bis 3 liegt das chirale Zentrum nicht zwischen

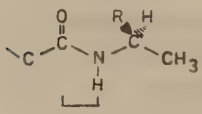
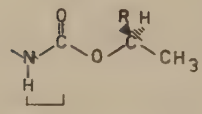
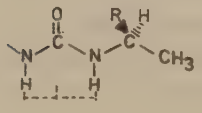
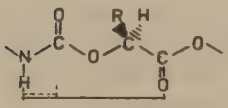
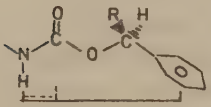
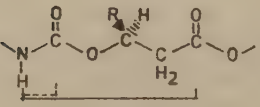
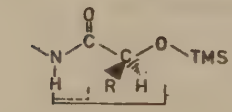
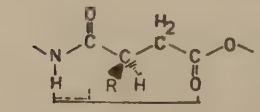
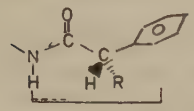
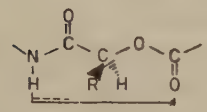
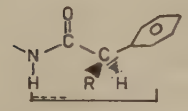
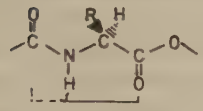
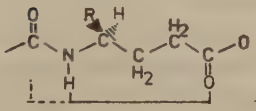
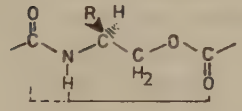
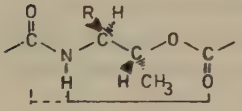
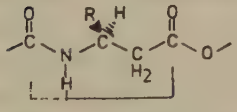
	Konfiguration	$-\Delta\Delta H$[calxMol^{-1}]	Substanz	Derivat
1)	 R	30	Amin	TFA
2)	 R	30	Alkohol	Urethan
3)	 R	95	Amin	Ureid
4)	 S	580	α OH-Säuren	OH Urethan COOH Ester
5)	 R	(310)	Mandelsäure	OH Urethan COOH Ester
6)	 R	(230)	Äpfelsäure	OH Urethan COOH Ester
7)	 S	190	α OH-Säuren	OH TMS COOH Amid
8)	 R	(100)	Äpfelsäure	OH TMS COOH Amid

Abb. 8: Inkremente, die einen Wasserstoffbrückendonor und Akzeptor besitzen. Es ist die Konfiguration dargestellt, die an Chirasil-Val stärker retardiert wird.

	Konfiguration		$-\Delta\Delta H$ [cal Mol^{-1}]	Substanz	Derivat
9)		S	(300)	Mandelsäure	OH TMS COOH Amid
10)		S	250	α OH-Säure	OH HFB COOH Amid
11)		R	(130)	Mandelsäure	OH HFB COOH Amid
12)		S	550	Aminosäuren	NH PFP COOH Ester
13)		R	(100)	Glu	"
14)		R	(280)	Ser	"
15)		R	(100)	Thr	"
16)		R	(400)	Asp	"

Fortsetzung der Abbildung 8

den Wasserstoffbrückenbildnern. Es resultieren kleine Enthalpieunterschiede, wobei sich beim Ureid die Vorteile der beiden ersten Inkremente zu vereinigen scheinen.

4. Inkrement: Die hier dargestellte Konstitution entspricht den C_7-Ringen, die schon lange als starke Wasserstoffbrückenbildner bekannt sind[44,45]. Die Differenz der Lösungsenthalpien ist bei dieser Konstitution sehr hoch. Das chirale Zentrum liegt direkt neben der Carbonylgruppe.

5. Inkrement: Es ist mit dem vorigen zu vergleichen. Die Carbonylgruppe ist durch einen Phenylring ersetzt, der ein bedeutend schwächerer Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor ist. Man darf nun nicht den in Klammern befindlichen Wert der Enthalpiedifferenz diesem Inkrement zuschreiben. Dies ist auch unter Berücksichtigung des ebenfalls enthaltenen Inkrements 2 nicht zulässig, das ebenfalls zu chiralem Erkennen führt, jedoch nur einen geringen Beitrag liefert. Um den $\Delta\Delta H$-Wert abzuschätzen, wird folgendes angenommen: Zum einen kann nicht gleichzeitig das Assoziat des Stammkörpers und das des zweiten Inkrements gebildet werden. Zum anderen ist das Assoziat, das durch den Phenylring gebildet wird, zu ca. 20 %, das des Stammkörpers zu 80 % realisiert. Dieses Verhältnis kann aus den McReynoldskonstanten von Chirasil-Val für Benzol und Keton[80] wie aber auch aus den Wasserstoffbrückenbindungsstärken von Benzol und Ethylacetat abgeleitet werden. In beiden Fällen beträgt der Wert des Aromaten ca. 30 % von dem der Carbonylverbindung. Es wird angenommen, daß die Wahrscheinlichkeit des Zustandekommens einer Bindung ungefähr proportional zu deren Stärke ist. Aus dem Verhältnis 100:30 wird die prozentuale Realisierung der beiden Inkremente von 77 % : 23 % errechnet.

Werden diese Annahmen zu Grunde gelegt, kann folgende Berechnung durchgeführt werden: Zur Abnahme der Enthalpiedifferenz führt einerseits die Realisierung des Inkrements 5 (x cal Mol^{-1}), das zur chiralen Erkennung zu Gunsten des

optischen Antipoden führt. Andererseits kann während dieser Zeit nicht mehr das Assoziat des "Stammkörpers" (1-Hydroxyisovaleriansäure) gebildet werden. Es gilt also

$$-310 = 0.8\,(-x) + 0.2\,(-660)$$

Es ergibt sich für x

$$x \approx -220 \text{ cal Mol}^{-1}$$

Da eine solche Berechnung mit großen Fehlern behaftet ist, werden die folgenden Inkremente empirisch bewertet.

Inkrement 6: Der hier ausgebildete C_8-Ring scheint kaum chirales Erkennen zu bewirken. Die Abnahme der Enthalpiedifferenz ist wohl im wesentlichen durch die Konkurrenz der beiden Estergruppen als Assoziationspartner mit der Phase, sowie durch das hier ebenfalls enthaltene Inkrement 2 begründet.

Inkrement 7: Daß auch ein durch zwei C-Atome getrennter Abstand der Wasserstoffbrückenbildner zur chiralen Erkennung führen kann, wird hier deutlich. Diese Konstitution ist mit einem von Gil-Av vorsichtig postulierten C_6-Ring zu vergleichen (Abbildung 9)[57].

Inkrement 8: Der hier abgebildete C_7-Ring ist vergleichbar mit dem in Inkrement 4. Das chirale Zentrum befindet sich jetzt allerdings in der Mitte zwischen den Wasserstoffbrückenbildnern. Dies scheint das chirale Erkennen beträchtlich zu mindern.

Inkrement 9: Dies ist das einzige Molekül, das in dieser Darstellung eine andere Konformation am chiralen C-Atom bei positiver chiraler Erkennung zeigt. Der Wasserstoff ragt nach vorne. Das ist umso erstaunlicher, da das Inkrement 11, das sich nur durch den Rest R unterscheidet,

eine "normale" Konfiguration am chiralen Zentrum zeigt. Eine Erklärung könnte darin liegen, daß sich durch die Nachbarschaft zweier voluminöser Reste, die in Abbildung 10 dargestellte Konformation einstellt, in der der Rest R' wie bei allen Inkrementen nach vorne ragt.

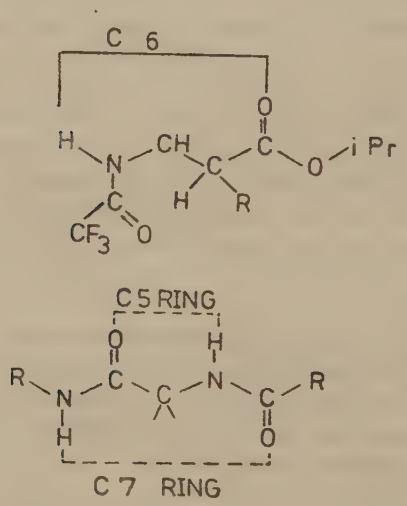
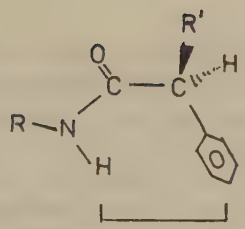


Abb. 9: Das C_6-Inkrement im Vergleich zum C_5- und C_7-Inkrement.

Wird der Rest R' durch eine Acyloxygruppe substituiert, wie das beim Inkrement 11 der Fall ist, wird diese Konformation nicht mehr realisiert.



R' = O-TMS

Abb. 10: Mögliche Anordnung zur chiralen Erkennung des O-TMS-Mandelsäurenpropylamids.

Inkrement 10: Die hier dargestellte Konstitution entspricht wieder einem C_7-Ring. Das chirale Zentrum liegt wie beim Inkrement 8 in der Mitte der beiden Wasserstoffbrückenbildner. Dies führt zu einer schlechteren chiralen Erkennung.

Inkrement 11: Wird beim siebten Inkrement die O-TMS-Gruppe durch einen Phenylring substituiert, erhält man die hier abgebildete Konstitution mit deutlich schlechterem chiralen Erkennen. Wasserstoffbrückendonor und Akzeptor sind durch zwei Atome getrennt.

Inkrement 12: Dieses Inkrement zeigt eine hohe chirale Erkennung. Dem C_5-Ring wird schon lange eine entscheidende Rolle bei der chiralen Erkennung zugesagt[44].

Inkrement 13: In dem C_7-Ring ist das chirale Zentrum auf die Seite der Amidgruppe gerückt. Das Absinken der Enthalpiedifferenz wird wohl nur durch das ebenfalls enthaltene Inkrement 1 und die in der Assoziation konkurrierenden zwei Estergruppen bewirkt. Das Inkrement scheint nur einen sehr kleinen Beitrag zum chiralen Erkennen zu leisten. Um die Ergebnisse der letzten vier Inkremente, von denen drei identisch sind, aber dennoch große Enthalpiedifferenzunter-

schiede zeigen, erklären zu können, wäre es von Nutzen die gesamten polaren Wechselwirkungen von Chirasil-Val mit diesen Aminosäuren zu kennen.

2.4. Quantitative Bestimmung der Lösungsenthalpiedifferenzen von Substraten in unterschiedlichen Phasen

Seit den grundlegenden Arbeiten von S.H. Langer[66] und J.K. Purnell[67] wurde die Gaschromatographie immer häufiger zur Bestimmung von freien Komplexierungsenthalpien - ΔG eingesetzt[68-71]. So entwickelte Schurig et al. eine Theorie zur Komplexierungschromatographie, die die Berechnung der Komplexierungsenthalpie eines Substrats mit einem Komplexbildner, ausgehend von Retentionsdaten des Substrats, gestattete[72]. Dabei wurden die Retentionsdaten der Substrate auf einer Phase, in der ein Komplexbildner gelöst worden war, mit den Daten einer Säule ohne Komplexbildner verglichen. Das größte Problem stellt bei solchen Vergleichen die möglicherweise unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten dar.

$$K = \frac{V_N}{V_L} = \frac{\text{Nettoretentionsvolumen}}{\text{Volumen d. flüssigen Phase}}$$

Die Bestimmung von V_L ist dabei mit erheblichen Fehlern belastet. Dies wurde umgangen, indem relative Retentionszeiten eingeführt wurden, die sich auf einen Standard bezogen, der keine Wechselwirkung mit dem Komplexbildner zeigt. Für diesen Standard setzte er den Verteilungskoeffizienten beider Säulen gleich. Dadurch konnte im weiteren Verlauf V_L eliminiert werden. Als Ganzes ist diese Berechnung aber nicht auf Chirasil-Val anwendbar.

Von B. Koppenhöfer[58] wurde ein Modell zur Berechnung der Gesamtwechselwirkungen der einzelnen optischen Antipoden

mit der optisch aktiven Phase entwickelt. Die Enthalpiedifferenz konnte hierbei aus der Temperaturabhängigkeit der Nettoretentionszeiten bestimmt werden.
Hier soll eine Berechnung für die Enthalpiedifferenzen eingeführt werden, die sich an die von Schurig entwickelte Methode anlehnt:

Zur Definition von verschiedenen Phasen werden McReynoldskonstanten benutzt. Dies sind Kovats-Indices bestimmter Substanzen. Die Werte sind im wesentlichen unabhängig von Säulenparametern und werden als Maß für die unterschiedlichen Wechselwirkungen benutzt. Wird der Kovats Index z.B. von Butanol auf Squalan und danach auf einer polaren Säule bestimmt, ist der Unterschied der Indices ein Maß für die polaren Wechselwirkungen von Butanol mit dieser Phase, unter der Annahme, daß an Squalan keine polaren Wechselwirkungen auftreten[73].

Analog werden nun die Kovats-Indices der Aminosäuren auf SE 30 und auf Chirasil-Val bestimmt. Die Differenz zwischen den Indices ist ein direktes Maß für die Differenz der Wechselwirkung der Aminosäuren auf SE 30 und Chirasil-Val. Mit diesen Daten können allerdings noch keine thermodynamischen Berechnungen angestellt werden. Nun ist es aber möglich aus Kovats-Indices wieder Nettoretentionszeiten zu errechnen. Für die Umrechnung der Indices, die auf Chirasil-Val bestimmt worden sind, wird nicht wieder die Beziehung zwischen Index-Chirasil-Val $\sim \log t_s$ (Abb. 11), was wieder zu den ursprünglichen Nettoretentionszeiten führen würde, benutzt; sondern wird die entsprechende Beziehung für SE 30 (Abb. 12) benutzt, erhält man errechnete "Nettoretentionszeiten" der D- und L-Aminosäuren auf SE 30. Diese stellen im Vergleich mit den Nettoretentionszeiten auf SE 30 selber ein Maß für den Unterschied der Wechselwirkungen der Aminosäuren zwischen SE 30 und Chirasil-Val dar. Wird diese Berechnung bei mehreren Temperaturen durchgeführt, können dann nach der Beziehung in 2.2. α-Werte und thermodynamische Parameter ermittelt werden, die den

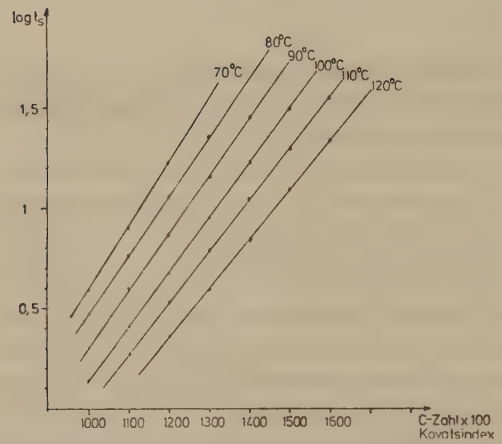


Abb. 12: Abhängigkeit der Nettoretentionszeiten von der Kettenlänge linearer Kohlenwasserstoffe bei verschiedenen Temperaturen zur Ermittlung der Kovats-Indices aus den Nettoretentionszeiten oder umgekehrt von SE 30.

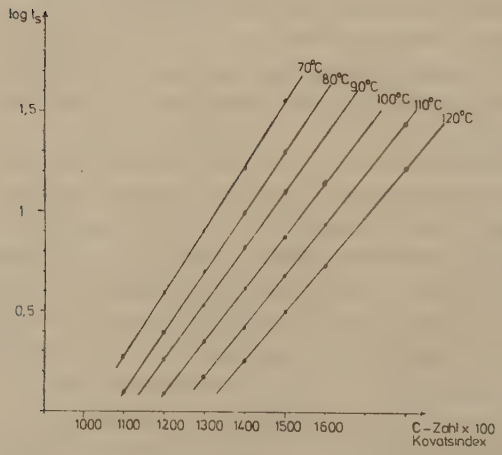


Abb. 13: wie Abb. 12 für Chirasil-Val

Unterschied z.B. der $\Delta\Delta H$-Werte der Aminosäuren zwischen SE 30 und Chirasil-Val darstellen. Diese Berechnungen werden für fünf Aminosäuren vorgenommen. In Abbildung 13 ist die Temperaturabhängigkeit der "α-Werte" der D- bzw. L-Aminosäuren und der entsprechenden Aminosäure auf SE 30 abgebildet, nachdem die Nettoretentionszeiten der Aminosäuren auf Chirasil-Val über die Kovatsindices in Nettoretentionszeiten auf SE 30 umgerechnet wurden.

2.4.1. Die Meßwerte und Diskussion

In Tabelle 6 sind die Unterschiede der thermodynamischen Parameter zwischen der Wechselwirkung der Aminosäuren mit SE 30 und Chirasil aufgelistet.

Daraus lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Asparaginsäure (Abb. 8 , Inkrement 16) scheint nicht, wie bisher angenommen, deshalb eine schlechte Auflösung in die Antipoden zu haben, weil eine Vielzahl konkurrierender Assoziate gebildet werden können. In diesem Falle müßte ein großer Lösungsenthalpieunterschied zwischen SE 30 und Chirasil-Val festgestellt werden. Eine Erklärung für die schlechte Auflösung kann durch intramolekulare Ringbildung nach Abbildung 14 gegeben werden. Diese würde die Bildung des Assoziats mit der Phase über den C_5-Ring des Stammkörpers verhindern.

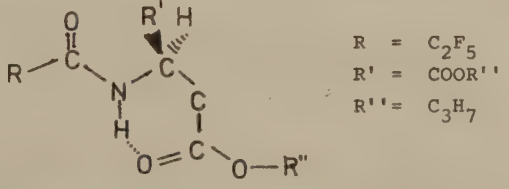


Abb. 14: Modell zur intramolekularen Assoziation des C_6-Inkrements.

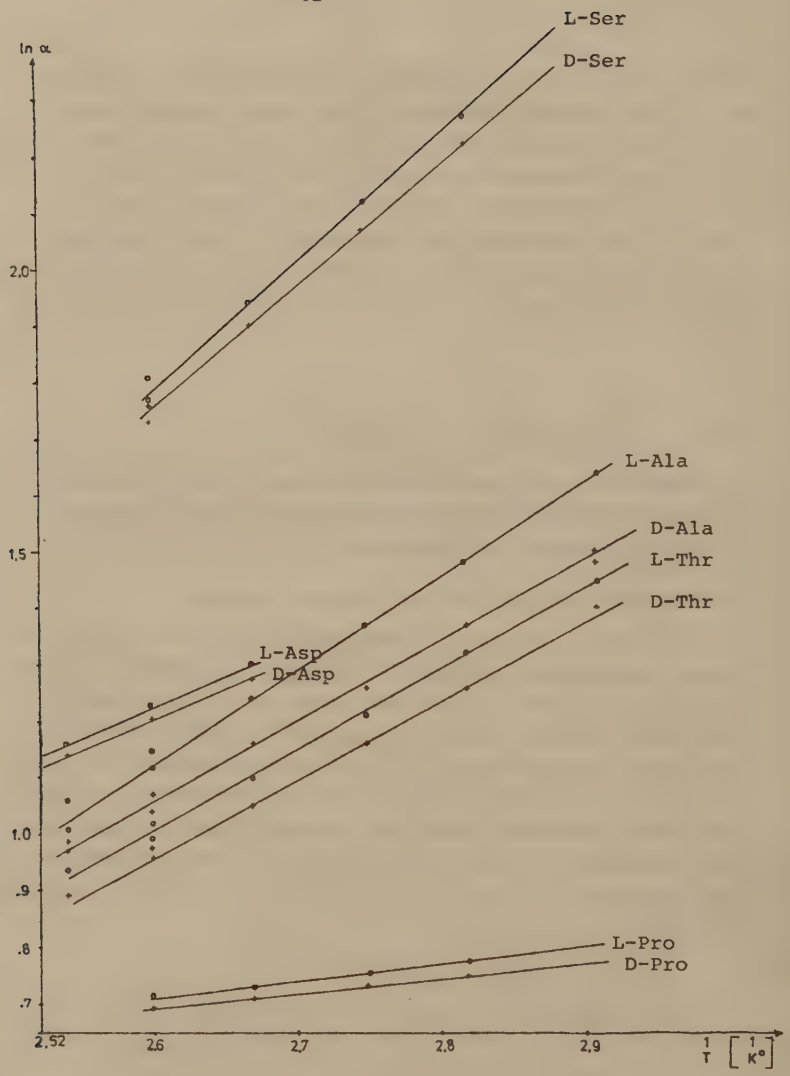


Abb. 13: Temperaturabhängigkeit von ln α der einzelnen Aminosäuren zwischen SE 30 und Chirasil-Val nach Umrechnung der Nettoretentionszeiten der Aminosäuren von Chirasil-Val auf SE 30 über die Kovats-Indices.

Tab. 6: Thermodynamische Parameter von Aminosäureenantiomeren

		Ala	Thr	Ser	Pro	Asp
$-\Delta\Delta H_{CV-SE\ 30}$ [cal mol^{-1}]	D	2885	2528	4138	528	1688
	L	3404	2901	4347	574	1787
$-\Delta\Delta G_{CV-SE\ 30}$ bei 110°C [cal mol^{-1}]	D	806	745	1323	524	890
	L	852	761	1360	538	911
$-\Delta\Delta S_{CV-SE\ 30}$ bei 110°C [cal K^{-1}, mol^{-1}]	D	5.43	3.47	7.35	0.01	2.08
	L	6.66	4.66	7.80	0.08	2.29
$-\Delta\Delta H_{D-L}$ CV [cal mol^{-1}]		443	296	171	30	103

Thermodynamische Daten. Die oberen drei Blöcke zeigen den Unterschied der Enthalpie, der freien Enthalpie und der Entropie der Aminosäuren zwischen einem Methylsilikon und Chirasil-Val.

Demgegenüber sind die Wechselwirkungsdifferenzen des Serins zwischen Chirasil-Val und SE 30 beträchtlich. Das Inkrement 14 in Abbildung 8 (Seite 33) scheint also ein relativ stabiles Assoziat mit der Phase bilden zu können. Das chirale Erkennen dieses "C_7-Rings" muß aber sehr gering sein, da sonst ein stärkerer Einfluß auf die Enthalpiedifferenzen zu erwarten wäre. Wird diese Konstitution mit den Inkrementen vier und zehn verglichen, ergibt sich eine deutliche Tendenz: Je weiter das chirale Zentrum im "C_7-Ring" vom Bindungsakzeptor entfernt ist, umso schlechter ist die chirale Erkennung. Beim Threonin ist die

Enthalpiedifferenz zwischen SE 30 und Chirasil-Val sogar geringer als bei Alanin. Die starken Wechselwirkungen des Serins treten nicht mehr auf. Auch die chirale Erkennung von Threonin auf Chirasil-Val ist bedeutend besser als die des Serins, schlechter aber als die des Valins. Ob auch hier in geringem Ausmaß wie bei der Asparaginsäure intramolekulare Ringbildung eine chirale Erkennung verhindert, ist nicht abzuschätzen. Mögliche starke unspezifische Wechselwirkungen analog des Serins würden durch einen solchen, sich zeitweilig bildenden unpolaren Ring kompensiert.

2.5. Zusammenfassung

In dieser Erörterung können bei weitem nicht alle Faktoren berücksichtigt werden, die zu einem Ansteigen bzw. Absinken der chiralen Erkennung führen. So sind z.B. in Modellrechnungen, die sich als überaus komplex gestalten und eine große Anzahl von Parametern enthalten, immer wieder Daten errechnet worden, die einen negativen Einfluß für die chirale Erkennung durch zwei Wasserstoffbrückenakzeptoren in 1,4-Stellung erwarten lassen. Dies deutet die Möglichkeit eines unspezifischen Assoziats dieser Konstitution an, da der negative Einfluß auf die chirale Erkennung sich immer für beide Enantiomeren errechnet. Sind die beiden Akzeptoren allerdings zum chiralen Zentrum fixiert, kann dies zu einer positiven Erkennung führen, wie z.B. beim Prolin. Ein ähnlicher Sachverhalt wurde z.B. auch für andere Substanzen postuliert[58]. Zusammenfassend kann folgendes gesagt werden: Hohe Auflösungen in die optischen Antipoden sind zu erwarten, wenn sich das chirale Zentrum zwischen einem Wasserstoffbrückendonor und -akzeptor befindet. Maximale chirale Erkennung findet man in Molekülen, in denen die Wasserstoffbrückenbildner entweder nur durch das chirale Zentrum oder zusätzlich durch zwei weitere Atome getrennt werden. Im letzten Fall scheint

die Positicn des chiralen Zentrums wesentlich zu sein. Gutes chirales Erkennen findet man, wenn das chirale Zentrum dem Wasserstoffbrückenakzeptor benachbart ist. Auch der "6-Ring", also die durch zwei Atome getrennten Wasserstoffbrückenbildner, scheint ein gutes chirales Erkennen möglich zu machen. In dieser Konstitution ist allerdings die Bildung von intramolekularen Assoziaten leicht möglich, durch die eine chirale Erkennung behindert wird.
Dies korrigiert die Aussage von Gil-Av[56], der aufgrund der sehr schwachen Trennung der β-Aminosäuren dieser Konstitution nur sehr schwaches chirales Erkennen zuschrieb. Begründet wurde dies damit, daß die Konfiguration der L-β-Aminosäure der von D-Asparaginsäure (Abbildung 15) entspricht, wenn die β-Carboxylgruppe betrachtet wird.

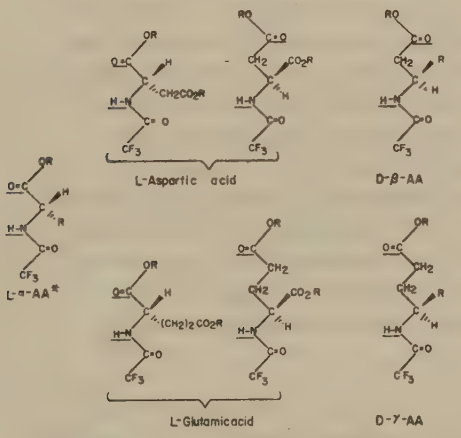


Abb. 15: Vergleich zwischen Asparaginsäure und β-Aminosäuren, sowie zwischen Glutaminsäure und γ-Aminosäuren.

In analoger Weise wurde die L-Glutaminsäure mit der γ-Aminosäure verglichen, die in umgekehrter Elutionsfolge eine bessere Auflösung als die β-Aminosäuren zeigt. Dies wurde mit hoher Stereoselektivität des C_7-Rings begründet. In beiden Fällen wurde ein Assoziationskomplex, wie er durch chirale Amide ausgebildet werden kann, nicht in Betracht gezogen.
Wird dieser berücksichtigt und folgt man den obigen Ausführungen, kann für β-Aminosäuren folgendes angenommen werden:
Durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen Amid- und Estergruppe wird zeitweise ein C_6-Ring gebildet. In dieser Konformation ist die Ausbildung des Assoziats nach dem Vorbild der chiralen Amide unmöglich. Die noch offenkettigen C_6-Einheiten führen zu einer guten chiralen Erkennung zu Gunsten der L-β-Aminosäure. Da das Assoziat analog der Amide mit dem optischen Antipoden stabiler ist, sind beide Effekte gegenläufig. Da der C_6-Ring eine bessere Auflösung in die Enantiomeren bewirkt als die Amidgruppe, resultiert eine kleine Auflösung, bei der die D- vor der L-β-Aminosäure eluiert wird. Im C_7-Ring der γ-Aminosäure ist das chirale Zentrum an den Wasserstoffbrückendonor gebunden. In diesem Fall findet eine chirale Erkennung zu Gunsten der L-γ-Aminosäure kaum mehr statt. Da die Assoziation analog der chiralen Amide auch nicht durch intramolekulare Wechselwirkung behindert wird, resultiert gute Auflösung in die Enantiomeren mit der Elutionsfolge D vor L.

Es bleibt festzuhalten, daß sich mit Hilfe einer inkrementellen Betrachtung eines chiralen Substrats die Möglichkeit bietet, die Auflösung in die Enantiomeren an einer chiralen Phase zu erklären. In der Erkennung aller Inkremente und deren relativen Einstufung liegt sicher die Schwierigkeit dieses Verfahrens. Hier werden aber z.B.

durch IR-Messungen einige Anhaltspunkte gegeben. Sie wurden in großer Anzahl durchgeführt, um die Stärke von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen verschiedenen Substraten zu bestimmen. Will man die Hydroxylgruppe mit in die Betrachtungen einbeziehen, stößt man auf Schwierigkeiten, da diese Gruppe sowohl als starker Wasserstoffbrückendonor wie auch als Akzeptor wirken kann. Außer den hier beschriebenen Wasserstoffbrückenbildnern können auch andere zu einer chiralen Erkennung an Chirasil-Val führen.Hier seien die chiralen Sulfoxide[47] oder chirale Phosphorverbindungen genannt[81].

3. AUTOMATISIERUNG IN DER GASCHROMATOGRAPHIE

3.1. Einleitung

Die Gaschromatographie, vor allem die Kapillargaschromatographie, besitzt im Vergleich zu anderen Analysenmethoden viele Vorteile. Die wichtigsten sind in der hohen Analysengeschwindigkeit, der hohen Auflösung und der Vielseitigkeit der Detektionsmöglichkeiten zu sehen. Die wohl wesentlichste Grenze der Gaschromatographie ist, daß die Probe bei der für die Chromatographie benötigten Temperatur verdampfbar sein muß. Durch die Entwicklung der Flüssigkeitschromatographie, insbesondere der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), wurde die Möglichkeit der chromatographischen Analytik beträchtlich vergrößert. So sind schwer bzw. nicht verdampfbare Substanzen, wenn sie detektiert werden können, durch die schnelle Flüssigkeitschromatographie analysierbar. Auch werden Anwendungsbereiche erarbeitet, die durch die Gaschromatographie erst nach mühsamer Probenvorbereitung z.B. Derivatisierung oder überhaupt nicht gelöst werden können. Aber nach einem Jahrzehnt scheint die stürmische Entwicklung der Hochleistungschromatographie abzuflachen. Es scheinen sich auf der technischen Seite die Grenzen der Entwicklung abzuzeichnen[82,83].

Durch mit Schrittmotor betriebene und programmierbare Kolbenpumpen mit Ausgangsdrücken um maximal 400 bar und Flußgeschwindigkeiten von 0.1 bis 10 ml/min konnten Programme für Gradientenelution genau und reproduzierbar durch Mischung der Eluenskomponenten auf der Hochdruckseite verwirklicht werden. Die Konstanz der Flußgeschwindigkeit ist aber bei geringeren Geschwindigkeiten merklich schlechter als angegeben, was bei programmierter Analyse

(Gradientenelution) stören kann. Da sämtliche bisher in der LC-Routine verwendeten Detektoren konzentrations- und nicht massengeschwindigkeitsempfindlich sind, bestimmt aber die Konstanz der Flußgeschwindigkeit des Eluens Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der quantitativen Analyse. Dies macht sich vor allem bei der Benutzung von Membranpumpen bemerkbar, die wesentlich zuverlässiger sind und weniger Wartung als die Kolbenpumpen bedürfen. Die Konstanz der Flußgeschwindigkeit beträgt nur $\pm$ 1.5 % bis $\pm$ 5 %. Nachteil der Membranpumpe ist die pulsierende Förderung, die durch Pulsationsdämpfer geglättet werden muß, deren Totvolumen bei der Gradientenelution störend wirkt. Die elektrische oder elektronische Steuerung dieser preiswerten und nicht mit Schrittmotoren betriebenen Pumpe ist aufwendig. Anscheinend wurde die optimale Pumpe für die HPLC noch nicht gefunden.

Die Leistungsfähigkeit und allgemeine Anwendbarkeit der Gaschromatographie wurde durch Einführung des Flammenionisationsdetektors (FID) außerordentlich gesteigert. Dieser Detektor ist massengeschwindigkeitsempfindlich, sein Rauschpegel ist sehr niedrig und sein Ansprechen (Response) ist in grober Näherung für Kohlenwasserstoffe unabhängig von deren Zusammensetzung und Struktur. Ein Detektionsprinzip ähnlicher Qualität wurde bisher für die HPLC nicht gefunden.

Die absoluten und relativen Retentionen der Probensubstanzen sind eine Funktion der Säulentemperatur. Erfahrungsgemäß genügt es nahe der Raumtemperatur meistens, die Säulentemperatur auf $\pm$ 1^{o}C konstant zu halten. Für Proben mit sehr großen Retentionen mag dies nicht ausreichen. Da chromatographische Säulen mit wärmeisolierenden Materialien gepackt werden, ist der radiale Wärmetransport stark eingeschränkt. Es reicht also nicht aus, nur die Säule von

außen zu thermostatisieren. Eine Vorthermostatisierung des Eluens ist notwendig.

Im Zeitalter der Mikroprozessoren muß die Trivialität besonders betont werden, daß Komponenten eines Probengemisches, die in der Säule nicht getrennt werden, auch mit elektronischen Mitteln nicht aufgelöst werden können. Das Kernstück des chromatographischen Systems bleibt nach wie vor die Trennkolonne. Die chromatographische Trennung ist auf die verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten der Probenkomponenten in der Säule zurückzuführen. Dabei werden die Unterschiede der Wanderungsgeschwindigkeit durch die verschiedenen Verteilungskoeffizienten der einzelnen Spezies zwischen mobiler und stationärer Phase verursacht. Die Verteilungskoeffizienten sind thermodynamische Größen, die von der stofflichen Beschaffenheit der Probe, der stationären und mobilen Phase sowie von der Temperatur abhängig sind.

Kann in der Kapillargaschromatographie auf einfache Weise die Temperatur variiert werden, ist dies in der Flüssigkeitschromatographie vor allem durch den Dampfdruck des Lösungsmittels bedingt in weit geringerem Ausmaß möglich[84)]. Hierfür stellt aber das Eluens einen zusätzlichen Freiheitsgrad dar, auf den in der Gradientenelution Einfluß genommen wird. In der zweidimensionalen HPLC kann durch Säulenschaltung auch die Selektivität der stationären Phase geändert werden[85)]. Auf diese technisch aufwendige Lösung kann in der Gaschromatographie wegen der hohen Trennleistung des Systems oft verzichtet werden. Die schwierigen Trennprobleme z.B. im Bereich der Biologie, Biochemie, Pharmazie etc. wo Bodenzahlen über 50 000 erforderlich sind und Kapillar-Gaschromatographie nicht anwendbar ist, wurden bisher kaum angegangen. Hierbei sind entweder die α-Werte klein und/oder die Anzahl der zu

trennenden Komponenten (und damit die erforderliche Peakkapazität) groß.

Allgemein kann gesagt werden, daß gaschromatographische Trennverfahren zur Trennung von flüchtigen Stoffen verwendet werden. Viele unter Normaldruck nicht flüchtigen Stoffe können in flüchtige Derivate überführt werden, die dann gaschromatographisch trennbar sind. Dadurch ist die obere Molekulargewichtsgrenze der Einsatzmöglichkeiten der Gaschromatographie nur sehr ungenau anzugeben.

Flüssig-chromatographische Verfahren werden vornehmlich zur Trennung von nicht unzersetzt verdampfbaren Substanzen verwendet. Bei kleinen und unpolaren Molekülen spielt bei der Sorption die Konkurrenz der im großen Überschuß vorhandenen Lösungsmittelmoleküle eine Rolle, so daß die flüssig-chromatographische Trennung unmöglich wird. Bei größeren Molekülen machen sich schon Ausschlußreaktionen bemerkbar. Die Flüssigchromatographie geht kontinuierlich in das Gebiet der Ausschluß-Chromatographie über, bei der die Trennung ausschließlich auf den Unterschied der Molekülgestalt beruht. In Abbildung 16 sind die Gebiete der drei chromatographischen Verfahren skizziert.

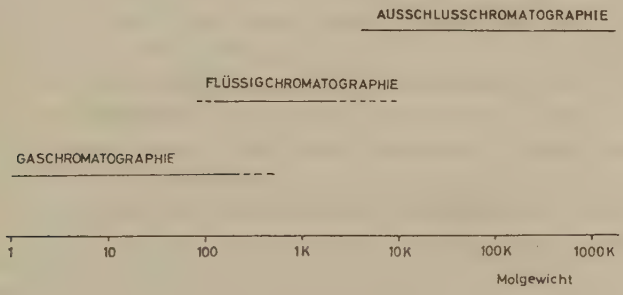


Abb. 16: Einsatzgebiete der chromatographischen Trennverfahren.

Die recht einfache weil weitgehend automatisierte Handhabung der Flüssigkeitschromatographen machte den Nachholbedarf auf diesem Gebiet in der Gaschromatographie deutlich. Es existieren zwar schon lange automatische Probengeber, aber die langwierige, bisher manuelle Derivatisierung wird wenig in Optimierungsbemühungen eingeschlossen. Im Forschungslabor, bei der Entwicklung von Analyseverfahren, tritt dieser Mangel weniger zu Tage, da Änderungen von Parametern der Probenvorbereitung während der Erstellung einer Analysenmethode ohnehin meist notwendig sind. Wenn diese optimiert ist, sollte für den Einsatz in der Routineanalytik eine weitgehende Automatisierung angestrebt werden. Dies ist in der Gaschromatographie oft mit großen Schwierigkeiten verbunden. So sind die bei einer Derivatisierung verwendeten Chemikalien meistens hochaggressiv und oft hochflüchtig[86], so daß sich die Handhabung recht schwer gestaltet. Zum zweiten ist der Beseitigung der Chemikalien Rechnung zu tragen. So sollten während der Probenvorbereitung keine Chemikalien und Lösungsmittel oder deren Dämpfe an die Umgebung abgegeben werden, sondern in einem Abfallgefäß zur späteren Vernichtung gesammelt werden. Die Möglichkeit dadurch von einem Abzugssystem unabhängig zu werden, ohne die maximalen Arbeitsplatzkonzentrationen (MAK-Werte) für solche Chemikalien zu erreichen, bietet einen weiteren Vorteil einer solchen Apparatur. Mit einem solchen Gerät ist es nicht nur möglich, die Derivatisierung zu automatisieren, sondern den gesamten Analysengang. Dazu wird die derivatisierte Probe in einen automatischen Probengeber eines Gaschromatographen mit einem entsprechenden Auswertesystem überführt. Die auf diese Weise durchgeführte Analyse bietet ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit und Trennleistung. Sie er-

möglicht den Einsatz der Kapillargaschromatographie als Routineverfahren grundsätzlich fast in jeder Analysenmethode, die zuvor nur nach mühsamer, manueller Derivatisierung möglich war.

Zu nennen sind hier vor allem die Trennung enantiomerer Verbindungen und die Fettsäure- sowie die Steroidanalytik. Aber auch in der HPLC sind Einsatzmöglichkeiten, z.B. die Dansylierung der Aminosäure zu sehen.

3.2. Anwendungsbereiche

Eine Vielzahl von gaschromatographischen Analyseverfahren wurden für Routineuntersuchungen entwickelt. In Fällen, in denen die GC-Analytik ohne Derivatisierung möglich war, fand sie schnell Anwendung als Routinemethode. Problematischer wird die Anwendung, wenn eine Derivatisierung notwendig ist. Für die genaue quantitative Analyse muß gewährleistet sein, daß die Umsetzung vollständig, auf jeden Fall aber reproduzierbar ist. Werden solche Analysenmethoden in Routineverfahren auf eine große Zahl von Proben angewendet, ist der mit der manuellen Derivatisierung verbundene zeitliche Aufwand im Vergleich zur Trennung groß und die Reproduzierbarkeit oft nicht ausreichend. Ein weiteres generelles Problem ist die Wahl eines geeigneten Standards[87]. Um eine genaue quantitative Analyse zu erhalten, ist meist die Verwendung eines internen Standards angezeigt.

3.2.1. Das Analyseverfahren "Enantiomerlabelling"[13]

Durch Anwendung neuer optisch aktiver Phasen ist es möglich, viele chirale Substanzen direkt gaschromatographisch in

ihre Enantiomeren zu trennen, ohne diastereomere Derivate bilden zu müssen. Aminosäuren, Hydroxycarbonsäuren, sowie die meisten chiralen Alkohole, Amine und Aminoalkohole können auf diese Weise auf ihre optische Reinheit analysiert werden.

Die meisten dieser Substanzen müssen vor ihrer Trennung in flüchtige Derivate überführt werden. Die bekannten Nachteile einer Derivatisierung vor der quantitativen Analyse, wie unvollständige Reaktionen und damit unterschiedliche Umsatzraten der einzelnen Substanzen, machen sich nicht bemerkbar. Das Analysenergebnis errechnet sich nämlich aus dem Verhältnis zweier Enantiomeren zu einander, die sich während des Analysenganges chemisch identisch verhalten.

Es ist somit möglich, die Enantiomerenreinheit oder Zusammensetzung mit großer Genauigkeit und Empfindlichkeit zu bestimmen.

Dadurch eröffnet sich nun die Möglichkeit einer sehr genauen quantitativen Bestimmung chiraler Substanzen, auch aus komplexen Gemisch wie biologischen Flüssigkeiten. Der bei solchen Analysen verwendete innere Standard sollte einerseits möglichst ähnliche chemische und physikalische Eigenschaften wie die zu bestimmende Verbindung aufweisen, chromatographisch aber trennbar sein. Dies ist in idealer Weise bei optischen Antipoden erfüllt, die in achiralem Medium identische chemische und physikalische Eigenschaften aufweisen, aber trotzdem an chiralen Phasen getrennt werden können. Gibt man ein Aliquot dieser Antipoden, z.B. einen D-Aminosäurestandard, vor der bei biologischen Flüssigkeiten notwendigen Aufarbeitung zu der Probe, werden sämtliche Fehler neutralisiert, die bei einer chromatographischen Analytik auftreten können: Verluste während der Aufarbeitung, unterschiedliche Umsatzraten und Verluste während der Derivatisierung, Fehler bei der Aliquotenentnahme und Diskriminierung

im chromatographischen System. Sollte die Probe selbst einen Anteil an unnatürlichen Enantiomeren enthalten, wie es z.B. bei synthetischen Aminosäuren möglich sein kann, wird dieser durch vorherige Bestimmung in einer Analyse ohne Standardzugabe bei der quantitativen Analyse berücksichtigt.

3.2.1.1. Anwendung auf Aminosäuren[13)]

Die Aminosäuren können auf drei chromatographische Methoden quantitativ bestimmt werden:

durch klassische Ionenaustauschchromatographie [88)]
durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie [89)]
durch Gaschromatographie nach Enantiomerlabelling [13)]

Die kapillargaschromatographische quantitative Bestimmung von Aminosäuren auf der Basis von Enantiomerlabelling wurde 1978 beschrieben und in ihrer Anwendbarkeit vor allem im klinischen Sektor unter Beweis gestellt[12,90,91)]. So konnten auf Grund der hohen Empfindlichkeit des chromatographischen Systems die Menge benötigten Serums auf 50 µl gesenkt werden, ohne einen nennenswerten Verlust an Genauigkeit zu erleiden. Der Grund hierfür ist sicher darin zu sehen, daß die Rückgewinnung der Aminosäuren während der Aufarbeitung nicht quantitativ sein muß, da schon zu diesem Zeitpunkt der interne Standard zur Probe gegeben worden ist. Die Genauigkeit der Analyse ist Tabelle 7 zu entnehmen.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die kurze Analysendauer. So werden in einem Zyklus von 45 Minuten die 20 Aminosäuren, die in natürlichen Proteinen vorkommen, quantitativ bestimmt. Es stellt sich die Frage, warum eine Methode, die der herkömmlichen in vielen Beziehungen über-

Tab. 7:

Aminosäure	Konz. (µmol)l)	Standard-abweichung %	Aminosäure	Konz. (µmol/l)	Standard-abweichung %
Ala	512	2.1	Met	35	2.9
Val	374	1.1	Phe	67	1.5
Thr	219	2.3	Gln	514	2.3
Ile	68	2.9	Glu	43	4.7
Gly	354	3.4	Tyr	78	1.3
Pro	288	0.4	Lys	214	2.8
Leu	246	0.8	Arg	98	4.1
Ser	155	2.6	His	104	1.9
Cys	188	3.2	Trp	65	4.6
Asp + Asn	150	2.7			

legen ist, nicht im Routinebetrieb eingeführt wurde. Die Antwort liegt sicher darin, daß für eine Analyse eine 2 stufige Derivatisierung notwendig ist, die manuell verrichtet werden muß. Auch die Analytik von Stein, Moore und Spackman war lange vorher bekannt. Schon 1957 wurde die Trennung der Aminosäuren an einem Ionentauscherharz[92)] beschrieben. Aber es dauerte sieben Jahre,bis der gesamte Prozeß, vor allem die Detektion, in einem automatisierten Prozeß vorgestellt werden konnte, und damit der Durchbruch zum Routineverfahren eingeleitet wurde.

3.3 Automatisierung der Derivatisierung

3.3.1. Einleitung

So mangelte es auch nicht an Versuchen,die Derivatisierung zu automatisieren. Von Packard Instrument Company, Downers

Grove, III., USA wurde vor zehn Jahren ein "Amino Acid Derivatizer" vorgestellt. Mit diesem Gerät konnte die Derivatisierung von Aminosäuren nur unter festgelegten Bedingungen durchgeführt werden. Eine weitere Schwäche des Gerätes war, daß die jeweiligen Proben zur Derivatisierung nacheinander in dasselbe Reaktionsgefäß überführt werden müssen, wodurch die Gefahr der Verunreinigung einer Probe mit Rückständen der vorherigen gegeben ist. Außerdem werden für die notwendigen Spülgänge zusätzliche Mengen von Lösungsmitteln benötigt. Schließlich war eine Überführung in eine automatische Dosiereinheit nicht vorgesehen, was den Nutzen eines solchen Automaten in Frage stellt.

Um die Probe in dem Gefäß zu derivatisieren, in dem sie auch in den Probengeber überführt werden kann, wurde ein Automat in Form eines Karusells konzipiert, in das ein Gefäß nach dem anderen eingeführt und nach erfolgter Derivatisierung wieder entnommen wurde[35]. Diese Lösung bot sich an, da zum einen die Dauer eines Derivatisierungszyklus ungefähr der Dauer einer Analyse durch den Gaschromatographen entsprach. Eine "batch"-weise Derivatisierung hätte nur unnötige Standzeiten der Probe vor der Chromatographie bedeutet. Zum anderen war die problemlose Überführung in einen handelsüblichen Einspritzautomaten möglich gewesen. Bei diesem Automaten wurde das Reaktionsgefäß in einen "Reakti-vial-port" gestellt, in dem es mit einem pneumatischen Zylinder dicht verschlossen werden konnte. Dieser "Reakti-vial-port" wurde samt dem Verschlußsystem in einer 360° Kreisbewegung über Heiz- bzw. Kühlzonen transportiert, wobei in bestimmten Stellungen Reagenzien dosiert oder wieder entfernt wurden. Schwierigkeiten bei diesem System ergaben sich vor allem beim Entfernen und Zugeben der Reagenzien. Dies erfolgte bei geöffnetem Reaktionsgefäß. Die dabei entweichenden aggressiven Dämpfe mußten mit einer Pumpe abgesaugt werden. Die Aggressivität der Dämpfe stellten hohe Anforderungen an die verwendeten

Materialien des "Abzugs". Eine weitere Schwierigkeit war die relativ hohe Wärmekapazität des "Reakti-vial-port". Da der Wärmeübergang schwer zu gestalten war, mußte mit langen Aufheizzeiten sowie Abkühlzeiten gerechnet werden.

3.3.2. Die Anforderung an einen Derivatisierungsautomaten

Analysenautomaten sind in den meisten Fällen problemspezifisch. Dies geht soweit, daß z.B. Prozeßchromatographen auf die Kontrolle einer bestimmten Reaktion abgestimmt werden. Der in dieser Arbeit entwickelte Automat stellt in Verbindung mit einem automatischen Probengeber, einem Gaschromatographen, und einem Auswertesystem einen Aminosäureanalysator dar. Die Trennsäule ist mit Chirasil-Val belegt. Die Aminosäuren müssen wie bei den herkömmlichen Aminosäureanalysatoren als Hydrochlorid oder in freier Form in den Analysator gegeben werden. Durch geringfügige Änderung im Ablauf läßt sich der Automat auch zur gaschromatographischen, automatischen Analyse von Hydroxycarbonsäuren, Fettsäuren und Steroiden, sowie aber auch zur Derivatisierung in der HPLC z.B. der Dansylierung von Aminosäuren verwenden.

3.3.3. Derivatisierung der Aminosäuren

Die Derivatisierung geschieht in einer 2-stufigen Reaktion.

1) Veresterung $R\text{-}COOH + R'OH \xrightarrow{H^+} R\text{-}COOR' + H_2O$

2) Acylierung

$$\begin{array}{lll} R\text{-}OH & + & R\text{-}O\text{-}CO\text{-}R' \\ R\text{-}NH_2 & + (R'\text{-}CO)_2O \longrightarrow & R\text{-}NH\text{-}CO\text{-}R' + R'COOH \\ R\text{-}SH & + & R\text{-}S\text{-}CO\text{-}R' \end{array}$$

Hierbei werden die in der Literatur beschriebenen Reaktionsparameter eingestellt. Die Probe durchläuft im Automaten folgenden Zyklus:

1) Zur Probe werden 0.2 ml Chlorwasserstoff/n-Propanol gegeben.

2) Das Gefäß wird verschlossen. Die Temperatur wird für 30 Minuten auf 110°C erhöht, danach auf ca. 70°C gesenkt.

3) Mit Stickstoff wird das überschüssige Reagenz abgeblasen. Hierbei wird die Temperatur wieder auf 110°C erhöht. Ist das Reagenz abgeblasen, wird auf Raumtemperatur abgekühlt.

4) Zur veresterten Probe werden 0.1 ml Pentafluorpropionsäureanhydrid gegeben.

5) Das Gefäß wird verschlossen, die Temperatur für 12 Minuten auf 150°C erhöht. Danach wird auf Raumtemperatur abgekühlt.

6) Mit Stickstoff wird das überschüssige Reagenz abgeblasen.

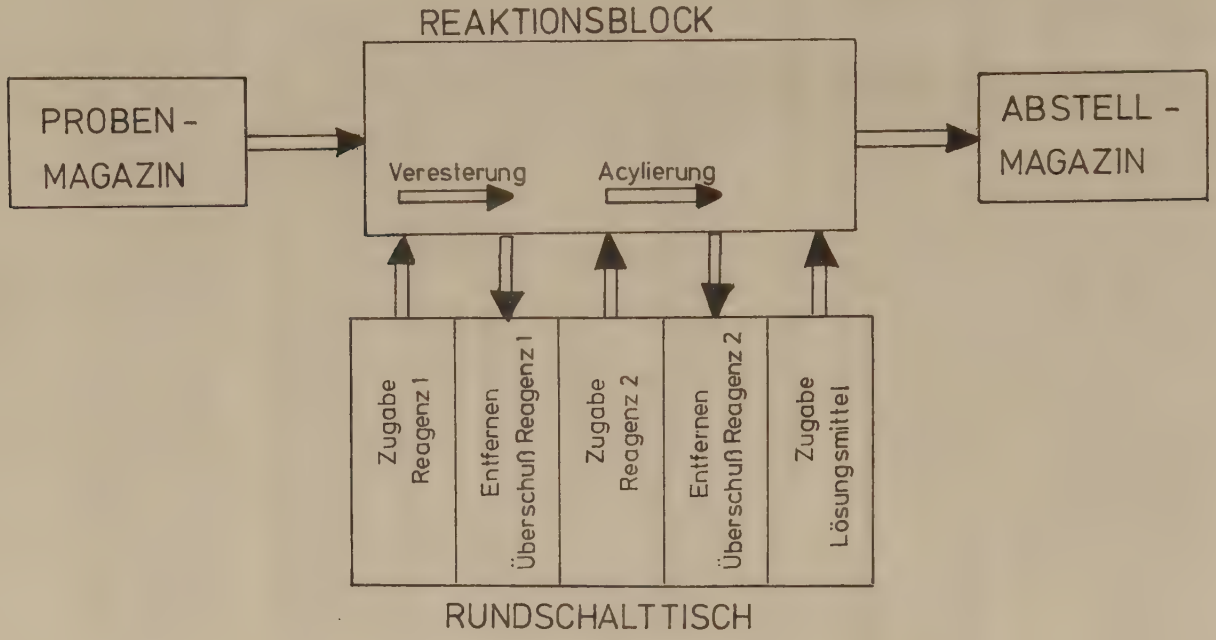
7) Die Probe wird in einem geeigneten Lösungsmittel für die Gaschromatographie gelöst, z.B. Toluol.

3.3.4. Aufbau des Derivatisierungsautomaten

Der Automat besteht aus vier Bausteinen (Schema 6), die in Abbildung 17 mit Ziffern gekennzeichnet sind. Die Bausteine sind auf einer Grundplatte befestigt.

1) Probenmagazin: Hier stehen die Proben, die nacheinander derivatisiert werden, in Warteposition.

2) Der temperatursteuerbare Block mit dem pneumatisch betriebenen Verschlußmechanismus, im folgenden mit Kopf bezeichnet. In diesen Block werden nacheinander die Proben gestellt, dort umgesetzt und wieder entnommen.



Schema 6: Schematischer Ablauf einer Derivatisierung.
Reagenz 1: n-Propanol/Chlorwasserstoff; Reagenz 2: Pentafluorpropionsäureanhydrid

Abb. 1 : Aufbau der Automaten

Abb. 18: Der Rundschalttisch von unten

3) Der Rundschalttisch: Durch ihn werden die Abläufe gesteuert, Reagenzien zugesetzt und Reagenzien entfernt. Pro Umdrehung des Tisches wird eine Probe bearbeitet.

4) Das Abstellmagazin: Dieses kann durch einen automatischen Probengeber ersetzt werden.

3.3.4.1. Die Steuerung

Ein Kontaktschleifer ist fest am Rundschalttisch angebracht (Abb. 18). Je nach Stellung des Tisches werden verschiedene in Abb. 19 gekennzeichnete Kontakte von 24 V Gleichspannung auf 0 Volt gelegt. Dadurch werden für eine bestimmte Zeit, die über eine Zeitschalteinheit gewählt werden kann, bestimmte Funktionen geschaltet. In Tabelle 8 sind die Schaltzustände der verschiedenen Kontakte, sowie die entsprechende Operation während der Derivatisierung dargestellt.

3.3.4.2. Das Transfersystem

Da es sich bei beiden Reagenzien (s. Schema 6) um aggressive Medien handelt, war es angebracht die Zugabe bzw. das Entfernen des Reagenz in einem geschlossenen System erfolgen zu lassen. Hierfür wurde ein Transfersystem entwickelt. Dies wird zwischen Kopf und Gläschen gebracht. Drückt der Kopf das System auf das Gläschen wird die Dosierung bei abgeschlossenem Reaktionsgefäß durchgeführt. Abbildung 20 zeigt das System im geöffneten Zustand. Wird der Kopf gesenkt, wird das Transfersystem, das mit einem Gelenk am Drehtisch befestigt ist, dicht auf das Gläschen gedrückt. Hierbei wird ein Entweichen aggressiver Chemikalien in die Umgebung vermieden. Durch die in Abbildung 20 gekennzeichnete Zuleitung, die nun im Gläschen endet, werden Reagenzien, Lösungsmittel oder Gase zugeführt. Das Hineinragen des Zuleitungskanals in das Probengefäß be-

Abb. 19: Schaltkontakte unter dem Rundschalttisch

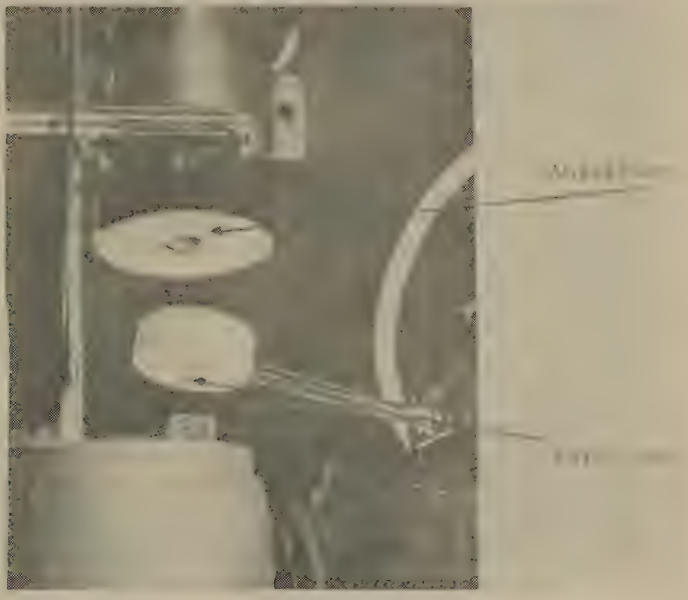
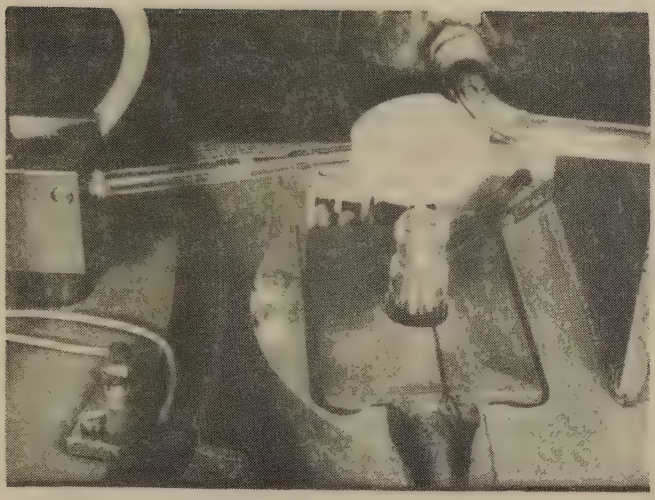


Abb. 20: Transfersystem im geöffneten Zustand

STEUERUNG

Funktion	Kontaktnummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	Stopzeiten (s)	7	7	30	30 min	90		6 min	6 min	30		12 min	6 min		6 min	30
	Drehtisch stoppt	X	X	X	X	X		X	X	X		X	X		X	X
	Pneumatik schließt sich															
Gefäßeingabe in den Block																
Gefäß vollständig im Block Lagertischvorschub		X														
Zugabe Reagenz 1				X												
Pneumatik schließt Gefäß Reaktion 1	Heizung T1				X											
Abkühlen auf 60 °C	Kühlung					X			X				X			
Gefäß wird geöffnet	Pneumatikschieft permanent				X	X	X				X		X	X		
Abblasen Reagenz 1								X								
Abkühlen auf 20 °C	Dosierung Reagenz 1								X							
Zugabe Reagenz 2	Dosierung Reagenz 2									X						
Pneumatik schließt Gefäß	Heizung T2											X				
Reaktion 2																
Abkühlen auf 20 °C																
Gefäß wird geöffnet																
Abblasen Reagenz 2	Abblasen							X								
Zugabe Lösungsmittel	Dosierung Lösungsmittel															
Entnahme des Gefäßes	Vorschub des Lagertischs		X													
Gefäß in den Lagertisch																

Tab. 8: Steuerung des Rundschalttisches



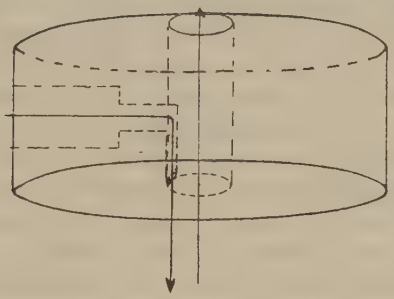


Abb. 21: Transfersystem von oben und im Schnitt

wirkt, daß eine Benetzung der Dichtfläche durch die zugeleitete Flüssigkeit vermieden wird und Lösungen und Gase in scharfem Strahl zugeführt werden. So ist bei Zugabe von Gasen eine geeignete Strömung, bei Zugabe von Flüssigkeiten ein gutes Abtropfen gewährleistet. Die Ableitung ist schräg durch das Transfersystem gebohrt und endet

azentrisch auf der oberen Fläche (Abbildung 21). Bei aufgepreßtem Kopf wird diese durch die ebenfalls azentrische Öffnung (s. Abbildung 20) im Kopf weitergeführt und mündet in einem Neutralisationsbad oder einem Abzug. Der Kopf dient auf diese Weise sowohl als Verschluß des Reaktionsgefäßes während der Reaktionen, da er dann mit dem im Zentrum eingedrückten teflonbeschichteten Gummi auf das Gläschen drückt, und auch bei zwischengeschobenem Transferkopf zum Abführen der Abgase.

3.3.4.3. Die Dosiersysteme

Es ist zu gewährleisten, daß der Zutritt von Luft zum Reagenz und das Entweichen flüchtiger Stoffe in die Atmosphäre vermieden werden. Dies wird durch das Dosiersystem in Abbildung 22 erfüllt. Die Zuleitung zum Transfersystem ist U-förmig ausgebildet. Ein Schenkel führt zum Transfersystem und über den anderen kann Argon oder Stickstoff unter leichtem Druck zugeführt werden. Über eine Öffnung am Tiefpunkt des U-Rohrs kann die zu dosierende Menge Reagenz eingebracht werden. Da die Anforderung an die Reproduzierbarkeit der zu dosierenden Menge gering ist, kann nach dem Prinzip der kommunizierenden Röhren aus einem offenen Vorratsgefäß dosiert werden. Abbildung 22 zeigt das System im drucklosen Zustand. Bei geöffnetem Inertgasventil wird das im U-Rohr befindliche Reagenz durch das Transfersystem in das Reaktionsgefäß gedrückt. Solange sich Flüssigkeit im U-Rohr befindet, wird das in der Zuleitung befindliche Reagenz in Richtung Ausgleichsgefäß gedrückt. Das Inertgas wird nach erfolgter Dosierung noch ca. 20 Sekunden durch das leere U-Rohr geblasen, um dieses zu trocknen. Während dieser Zeit läuft das Reagenz in der Zuleitung wieder in Richtung U-Rohr. Bevor es dieses erreicht, wird der Inertgasstrom abgestellt. Es stellt sich wieder der drucklose Zustand ein. Dabei kann durch die Restriktion das verdrängte Gasvolumen des U-Rohrs entweichen.

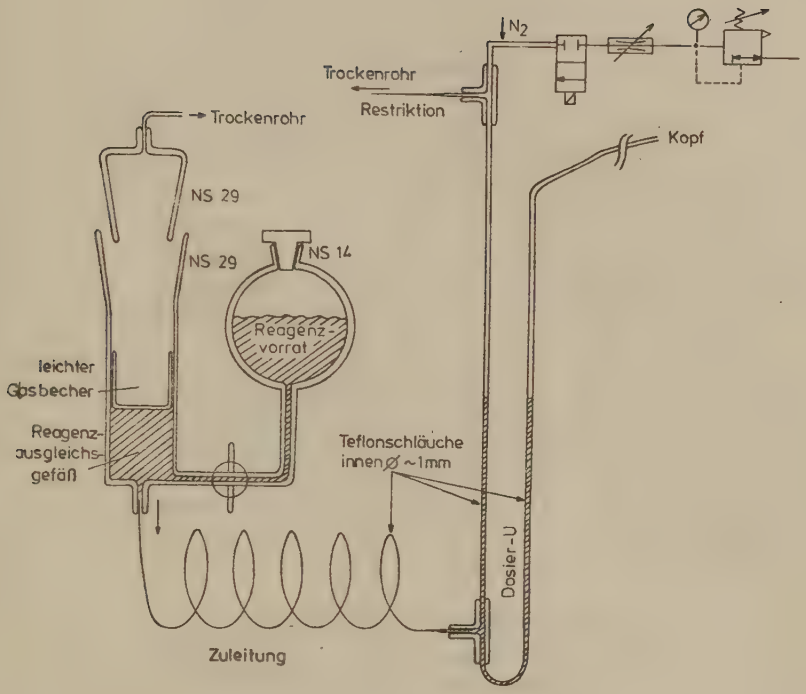


Abb. 22: Dosiersystem nach dem Prinzip der kommunizierenden Röhren

Die Dimensionierung der Zuleitung muß so erfolgen, daß das Reagenz in ihr beim Dosiervorgang nicht vollständig zurückgeblasen wird, aber auch nicht durch den hydrostatischen

Druck während der Trocknungszeit in das U-Rohr fließt. Dies ist von vielen Faktoren abhängig, wie z.B. dem Inertgasdruck dem Röhrendurchmesser, der Größe der Restriktionen auf der Druckseite des U-Rohrs und auf der Seite des Transfersystems, und natürlich auch vom Innendurchmesser der Zuleitung selbst und der Viskosität des zu dosierenden Mediums. Deshalb wurde die Länge experimentell ermittelt. Bei einem Innendurchmesser des U-Rohrs von 1.7 mm und einer Länge von 40 cm, muß die Zuleitung, die einen Innendurchmesser von 1.2 mm hat, 50 cm lang sein, um die zwei Reagenzien und das Lösungsmittel bei einem Inertgasstrom von 100 ml bei einem Vordruck von 0.4 bar dosieren zu können.

Handelt es sich um ein hochflüchtiges Reagenz, so daß selbst durch ein so schweres Inertgas wie Argon die Diffusion nicht hinreichend unterdrückt werden kann, so kann statt nach dem Prinzip der kommunizierenden Röhren mit einem Vier-Wege-Ventil (Abbildung 23) dosiert werden. Dieses Ventil ist entweder direkt mit dem Transfersystem oder mit dem Tiefpunkt des U-Rohres verbunden.

Abbildung 23 zeigt das System in Ruheposition. Hierbei füllt sich die Dosierschleife mit Reagenz. Die Dosierung erfolgt durch eine kontinuierliche Drehung des Ventilkükens um 360° im Uhrzeigersinn. In 90° Stellung wird das Reagenz in der Dosierschleife durch den Überdruck im Gasraum der Vorratsflasche, mit dem die Dosierschleife verbunden ist, in Richtung Transfersystem gedrückt. In 180° Stellung wird die Flüssigkeit vollständig in das Reaktionsgefäß gedrückt und die Leitung trockengeblasen. In 270° Stellung wird der Überdruck im Vorratsgefäß wieder hergestellt und in der Endstellung wieder die Dosierschleife gefüllt.

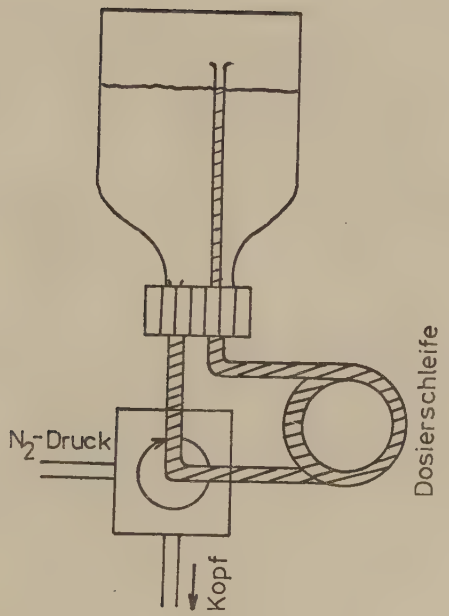


Abb. 23: Dosiersystem

Zur Herstellung dieses Systems wird der Teflondeckel einer Glasflasche mit 2 Bohrungen versehen, die um ca. 0.4 mm kleiner sind als der des Teflonschlauchs, der verwendet werden soll. Es werden Schläuche mit einem Außendurchmesser von 1.7 mm benutzt. Die Löcher werden mit einem Durchmesser von 1.3 mm gebohrt. Zwei Teflonschläuche, der eine 6, der andere 25 cm lang, werden durch die Löcher gezogen. Dazu

werden zum Einführen in die Löcher, die Enden verjüngt. Nach dem Durchführen werden die Verjüngungen wieder abgeschnitten. Die Abdichtung erfolgt nun durch Presspassung. Der lange Schlauch ragt soweit in die Flasche, daß er bei umgedrehter halbvoller Flasche im Gasraum endet. Der andere ragt kaum in die Flasche. Beide Schläuche sind, um ein versehentliches Herausziehen zu vermeiden, umgebördet. Nun werden die Teflonschläuche nach Abbildung 5 an ein Ventil angeschlossen. Es wurde ein Hamilton Ventil HVP 4-2 verwendet.

Mit diesem System können hochflüchtige und hochaggressive Substanzen unter vollständigem Luftabschluß dosiert werden. Die Reproduzierbarkeit der Dosiermenge hängt vom Verhältnis des Volumens der Dosierschleife zum Volumen der Verbindung zwischen Dosierschleife und Gasraum des Vorratsgefäßes, das ebenfalls dosiert wird, ab. Dieses Volumen hängt aber vom Flüssigkeitsstand im Vorratsgefäß ab. Das Verhältnis der Volumina ist möglichst groß zu Gunsten der Dosierschleifen zu wählen.
Dies kann durch die Wahl des Innendurchmessers des Teflonschlauchs geschehen. Benutzt man einen Teflonschlauch mit einem Innendurchmesser von einem Millimeter, so benötigt man, um ein Volumen von 0.2 ml zu dosieren, eine Länge des Schlauches von ca. 25 cm ($v = \pi r^2 h$). Beträgt die maximale Höhe des Flüssigkeitsspiegels in der Vorratsflasche 6 cm, die minimale 1 cm, so beträgt der Unterschied im Dosiervolumen bei hohem bzw. niederem Flüssigkeitsstand ca. 0.04 ml, dies sind ca. 20 %. Halbiert man den Innendurchmesser, benötigt man 100 cm Schlauch als Dosierschleife. Der Fehler bei gleichen Bedingungen beträgt nur noch 0.01 ml, dies sind 5 %. Bei Zugabe von Reagenzien sind solche Fehler zu akzeptieren. Bei höherer Anforderung an die Reproduzierbarkeit muß das Volumen der Verbindung zwischen Gasraum der Flasche und Dosierschleife weiter verringert werden.

3.3.4.4. Der Ablauf

Das Vorratsmagazin wird mit Probengläschen gefüllt. Diese werden durch eine Feder zusammengedrückt, so daß das erste Gläschen unter einem Stempel über einem Loch an die Wandung des Magazins gedrückt wird. Der Druck ist so groß, daß das Gläschen nicht herausfällt.

Position 1: Das Vorratsmagazin wird zwischen dem leeren Block und dem Kopf so gedreht, daß die erste Probe über dem Loch des Blocks justiert ist. Der Kopf senkt sich. Das Gläschen wird durch den Stempel ungefähr zur Hälfte in das Loch gedrückt. Der Kopf hebt sich und der Stempel wird durch Federn wieder in die Ausgangsposition gebracht. Der Rundschalttisch bewegt sich zur nächsten Position. Dabei wird das Gläschen seitlich durch eine Öffnung (s. Abbildung 18) aus dem Vorratsmagazin geführt. Die nächste Probe wird in die nun freie Position im Magazin gedrückt.

Position 2: Durch kurzes Absenken des Kopfes wird das Gläschen vollständig in den Block gedrückt.

Position 3: Über ein Transfersystem wird Chlorwasserstoff/n-Propanol zur Probe gegeben (Beschreibung s.o.).

Position 4: Das Reaktionsgefäß wird durch Absenken des Kopfes verschlossen. Der Block wird für 30 Minuten auf 110°C erhitzt.

Position 5: Der Block wird auf 60-70°C gekühlt. Dies geschieht, indem Diethylenglykol in einem Kreislauf durch eine Bohrung des Blocks und einen Wärmetauscher gepumpt wird.

Position 6: Das Gläschen wird geöffnet.

Position 7: Über ein Transfersystem wird mit Inertgas überschüssiges Reagenz abgeblasen. Hierbei wird der Block auf 110°C erhitzt.

Position 8: Der Block wird auf 20°C gekühlt.

Position 9: Pentafluorpropionsäureanhydrid wird über ein Transfersystem dosiert.

Position 10: Das Reaktionsgefäß wird geschlossen.

Position 11: Für 12 Minuten wird der Block auf 150°C erhitzt.

Position 12: Es wird wieder auf 20°C abgekühlt.

Position 13: Der Kopf hebt sich.

Position 14: Über ein Transfersystem wird mit Inertgas das überschüssige Reagenz abgeblasen.

Position 15: Zur Probe wird Lösungsmittel über ein viertes Transfersystem gegeben.

Nun wird mit dem in Abbildung 18 gekennzeichneten Greifer das Gläschen aus dem Block gezogen, über das Abstellmagazin transportiert und dort losgelassen. Über eine Führung gleitet das Gläschen in eine leere Position dieses Tisches. In Position 2 des Rundschalttisches wird das Abstellmagazin um eine Position weitergedreht.

Nun ist das Vorratsmagazin wieder bei Position 1 angelangt und die nächste Probe kann derivatisiert werden.

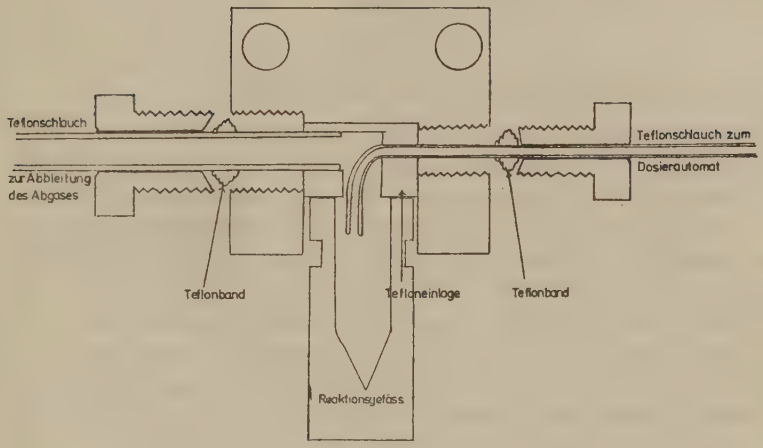


Abb. 24: Das Transfersystem

3.3.5. Weitere Realisierungsmöglichkeiten

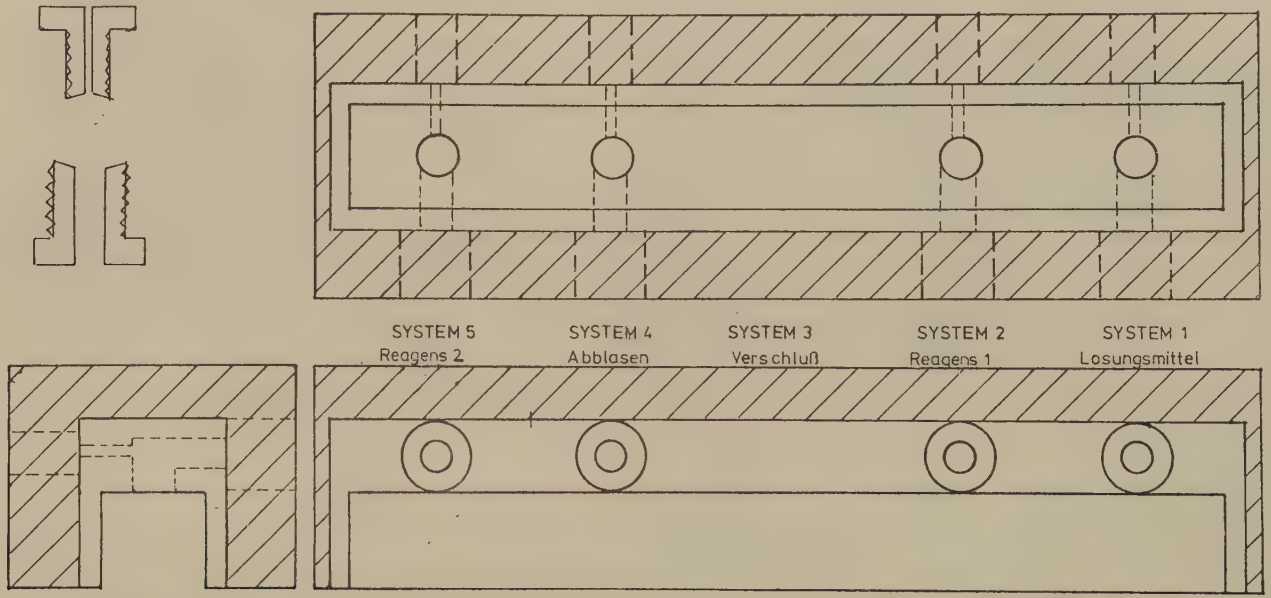
Durch dieses Gerät sollten die Möglichkeiten der Automatisierung der Probenvorbereitung dargestellt und erprobt werden. Der Aufbau der Apparatur wurde so gewählt, daß jede während eines Derivatisierungszyklus auszuführende Operation einzeln beobachtet und modifiziert werden kann. Dies führt verständlicherweise zu einer Apparatur, die überdimensioniert und oft auch unnötig kompliziert wirkt. Für die Neuentwicklung eines Gerätes scheint dieser Weg unumgänglich. So bieten sich jetzt nach zufriedenstellender Erprobung der Einzelabläufe, Möglichkeiten an, einen Automaten zu konzeptionieren, der die Lösung der Probleme

in einer kompakteren Form bietet.

3.3.5.1. Konzepte für einen kompakten Automaten

Durch geringe Veränderungen des Transfersystems (Abbildung 24) ist es möglich, die vier benötigten Systeme und den Verschluß für das Reaktionsgefäß linear in einem sogenannten Transferkopf anzuordnen (Abbildung 25). Nun wird aus einem Magazin mit einem Gefäß-Überführungsautomaten ein Probengefäß in die entsprechende Bohrung eines temperatursteuerbaren Blocks eingesetzt. Durch Verschieben des Blocks oder des Transfer-Kopfes werden das Probengefäß und das jeweilige Transfersystem zueinander justiert, und zwar so, daß durch Aufeinanderzubewegen des Blocks und des Transfer-Kopfes das Probengefäß und das jeweilige Transfersystem dicht aufeinander gedrückt werden (Abbildung 26). Für die Realisierung dieser Apparatur bieten sich zwei Varianten an. In der in Abbildung 27 dargestellten Apparatur bleibt der Heiz- und Kühlblock fest in einer Position. Sämtliche Bewegungen, sowohl die vertikale wie auch die horizontale, werden durch den Kopf ausgeführt. Durch eine Primärpneumatik wird dieser auf das Reaktionsgefäß gedrückt. Der Kopf kann auf einer Führung durch die Sekundärpneumatik in vertikaler Richtung verschoben werden. Die Pneumatik besteht aus 3 Zylindern der Länge L, 2 x L und 4 x L, die alle in Reihe geschaltet sind. Der Kolben des ersten ist am Kopf befestigt, der Körper des letzten an der Führung. Durch unterschiedliche Schaltungen der Zylinder können 8 äquidistante Stellungen durch den Kopf eingenommen werden. Somit ist es möglich, neben den 4 Transfersystemen auch die Zange für den Gefäß-Überführungsautomaten zu integrieren, wobei diese Position mit ihrer teflonbeschichteten Decke auch zum Verschließen des Reaktiongefäßes während der Reaktionen benutzt wird. Soll das

Abb. 25: Der Transferkopf



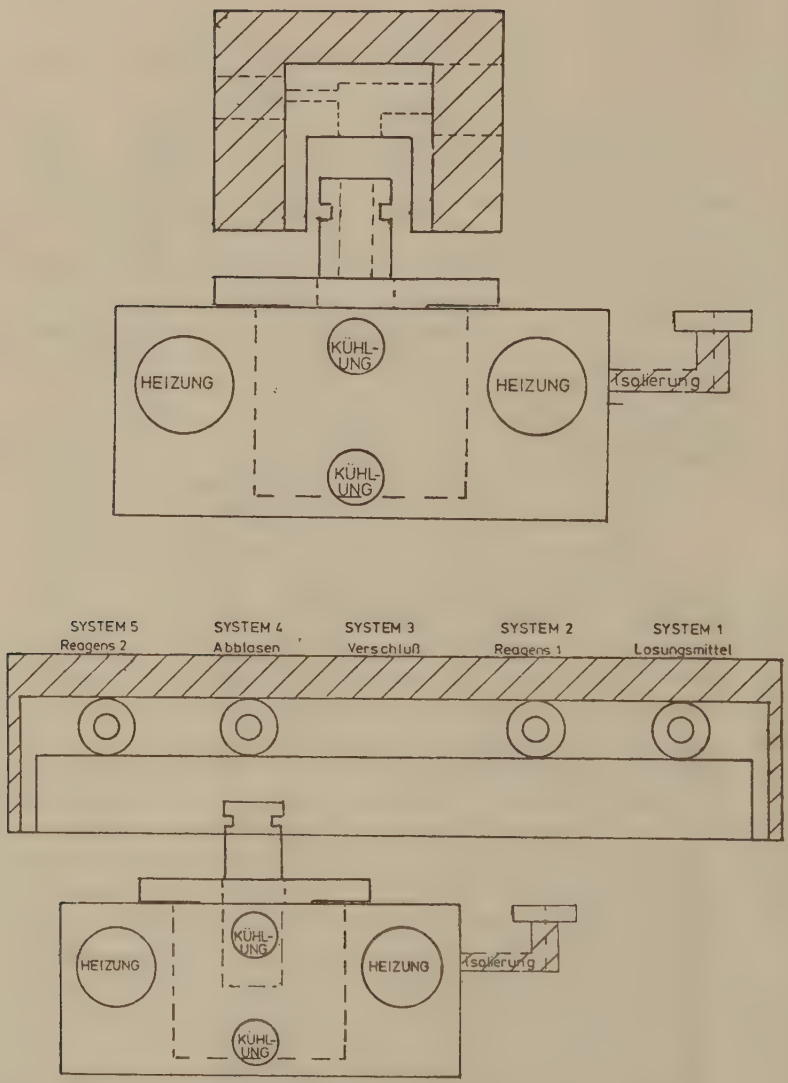
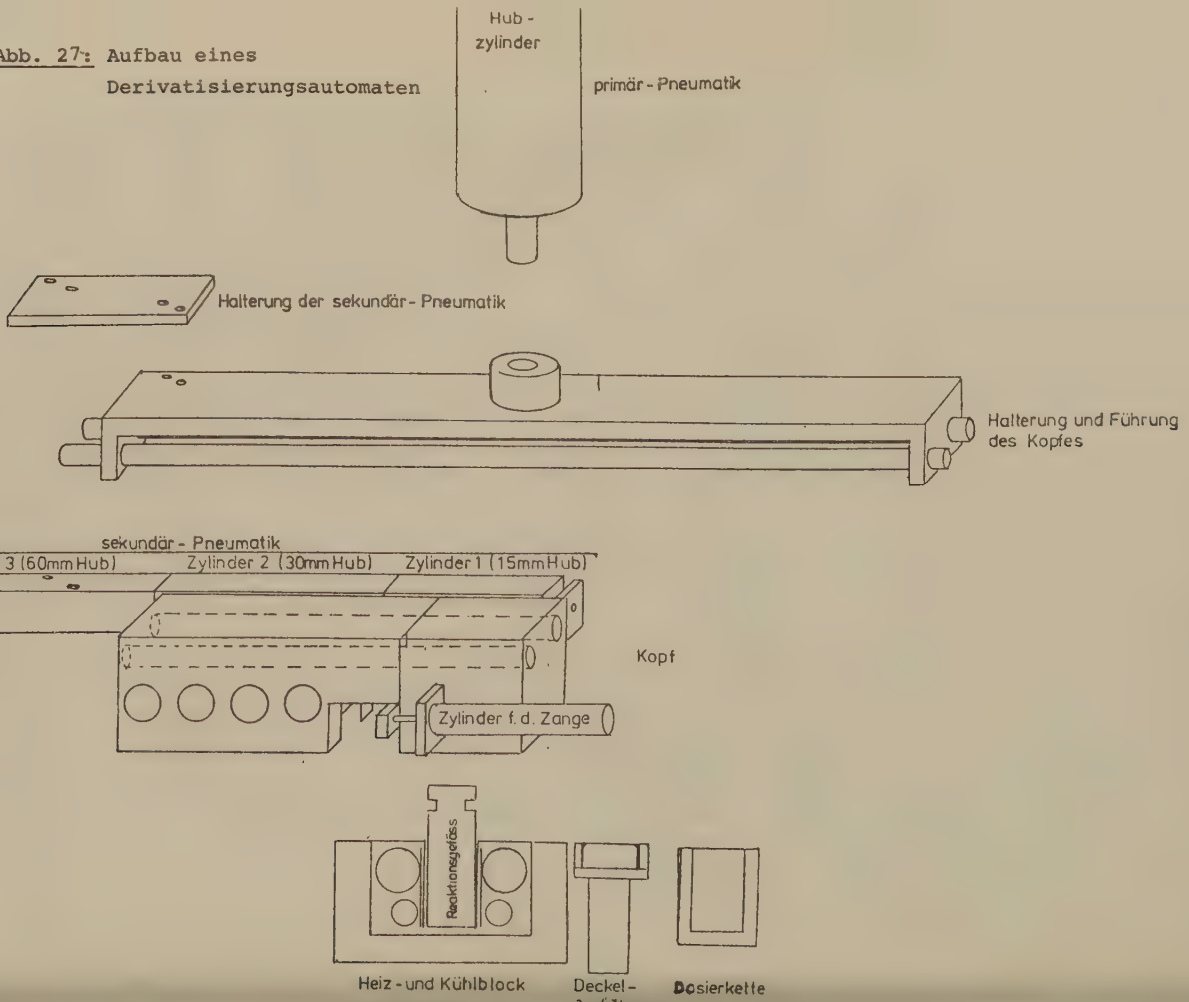


Abb. 26: Positionierung von Kopf und Block

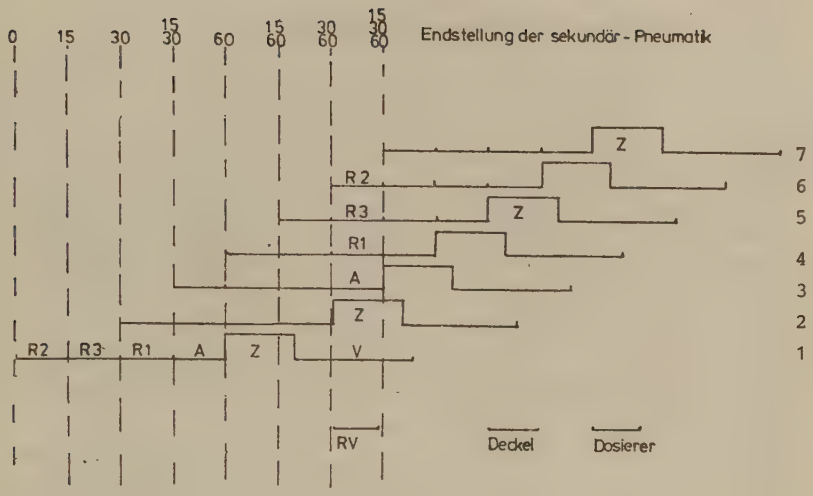
Abb. 27: Aufbau eines Derivatisierungsautomaten



Gefäß nach der Derivatisierung verschlossen werden, kann an den Kopf auch ein Verschlußmechanismus für z.B. Bördelkappen angebracht werden. Die möglichen Positionen eines solchen Kopfes relativ zum Reaktionsgefäß, zum Deckelmagazin und zum Dosierautomaten sind in Abbildung 28 dargestellt.

Das diese komplexe Apparatur auch eine differenziertere Steuerung benötigt, ist aus Abbildung 29 zu ersehen.

Ein von der Mechanik her einfacheres Konzept ergibt sich durch Trennung der beiden Bewegungen. Befestigt man den temperatursteuerbaren Block temperaturisoliert auf einen Linearschlitten (Abbildung 30) und bewegt diesen mit der oben erläuterten Sekundärpneumatik, muß der Transferkopf nur noch die vertikale Bewegung durchführen, wenn der Schlitten unter dem Kopf befestigt wird. Da allerdings bei diesem Modell Scherkräfte in der Primär-Pneumatik auftreten würden, wenn der Kopf direkt auf den Hubzylinder geflanscht würde, muß für die vertikale Bewegung ein Säulengestell nach Abbildung 31 verwendet werden. Auf dessen bewegliche, mittlere Platte wird der Transferkopf befestigt. Diese Scherkräfte treten beim ersten Modell nicht auf, da der Druckpunkt des Kopfes auf das Gläschen immer lotrecht zur Primär-Pneumatik liegt. Die Steuerung des zweiten Modells ähnelt der in Abbildung 29 und ist in Abbildung 32 dargestellt. Die Steuerbefehle für die Zange entfallen und werden durch die für einen gesonderten Überführungsautomaten ersetzt.



RV: Position des Reaktionsgefäßes
Deckel: Position des Deckelmagazins
Dosierer: Position der Dosierkette
R 2: Transfersystem für das Reagenz 2
R 3: Transfersystem für das Reagenz 3
R 1: Transfersystem für das Reagenz 1
A Transfersystem für Inertgas zum Abblasen der überschüssigen Reagenzien
Z Die Zange, die aus den drei ersten Positionen Deckel oder Reaktionsgefäß greifen kann, und auch zum Verschließen des Gefäßes während der Reaktion dient
V Verschlußmechanismus z.B. eine Zange zum bördeln von Deckeln.

Es sind 7 Stellungen des Transferkopfes relativ zu den festbleibenden 3 ersten Positionen dargestellt. Bezeichnet sind, außer bei der ersten Darstellung, die Systeme, die in dieser Stellung in Funktion treten können.

Abb. 28: Kopfstellungen

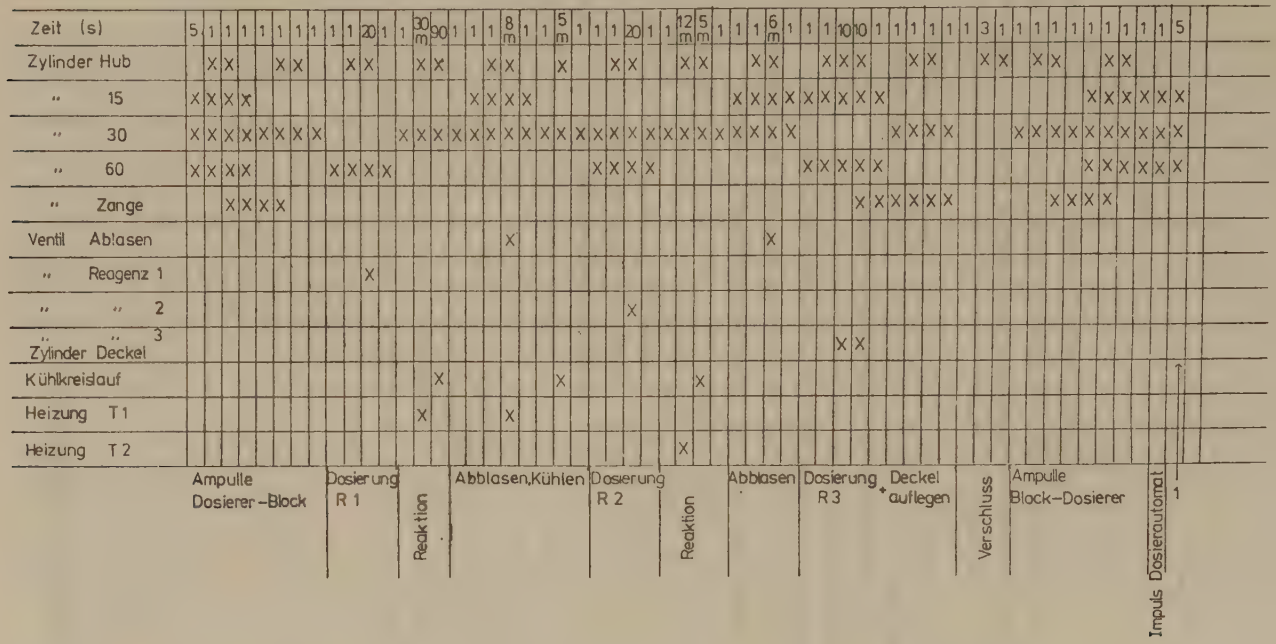


Abb. 29: Steuerung für einen Automaten nach Abbildung 24. Gekennzeichnete Felder bedeuten ein hohes Schaltsignal. Aufeinanderfolgende Kennzeichnung bedeuten ein Dauerimpuls

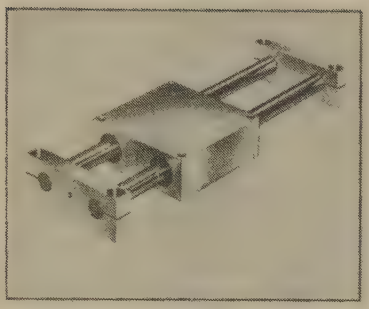


Abb. 30: Linear-
schlitten

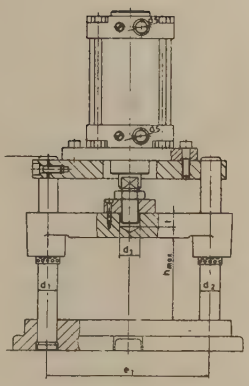


Abb. 31: Säulengestell
für den Transfer-
kopf

Die Realisierung des letzten Modells ist in Abbildung 33 und 34 zu sehen. Die Steuerung erfolgt durch einen Siemens Gaschromatographen Sichromat 1. Die Proben werden aus dem automatischen Probengeber von Siemens (Autosampler 200) entnommen, in den temperatursteuerbaren Block des Derivatisierungsautomaten gestellt, derivatisiert und wieder in den Probengeber gestellt.

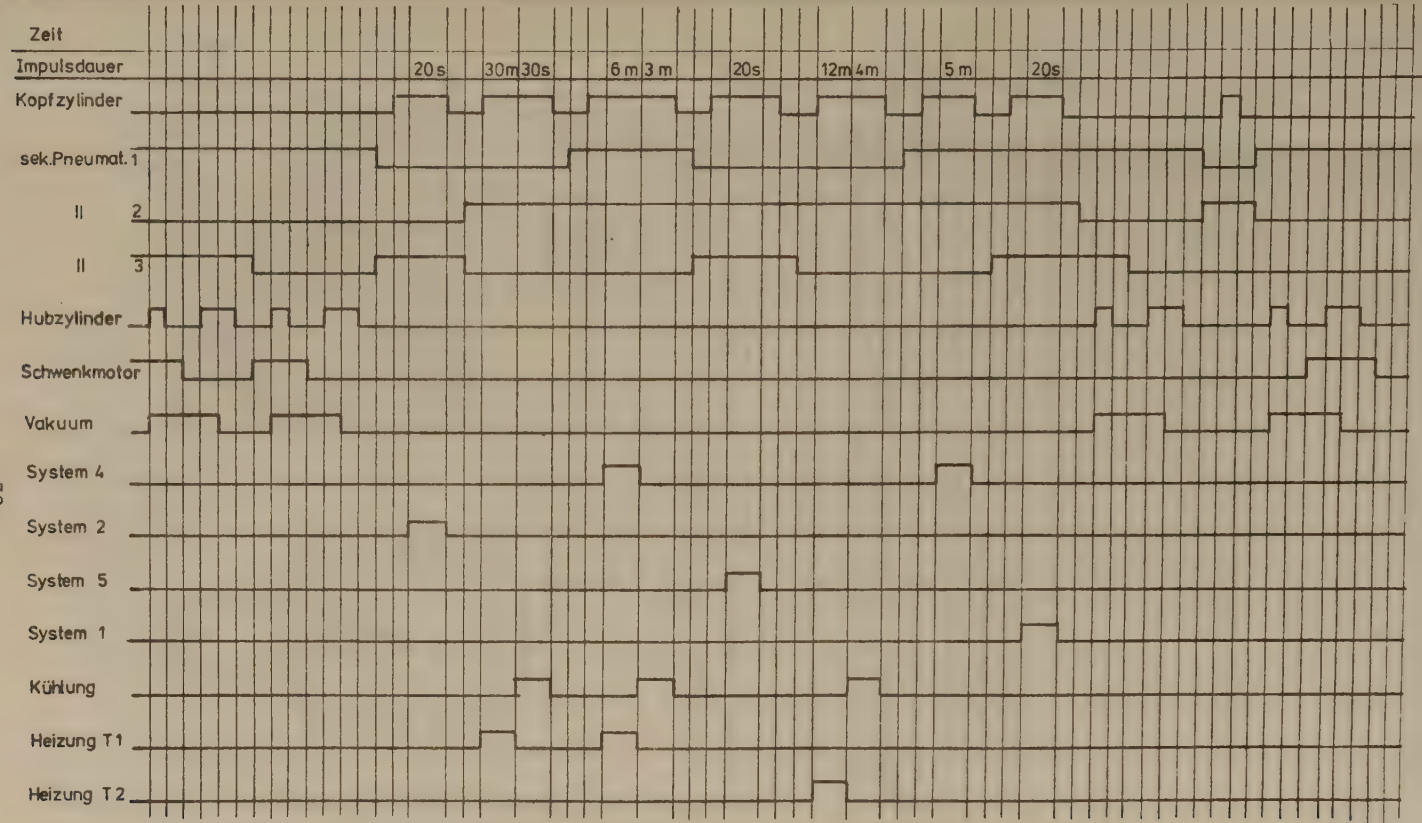


Abb. 32: Steuerung für Derivatisierungsautomaten mit bewegbaren Ofen

Reset+Start GC

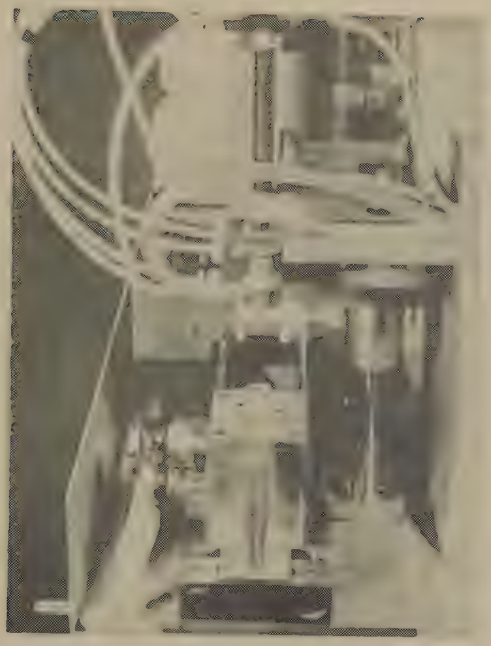


Abb. 33: Linearschlitten und Säulengestell für den Transferkopf

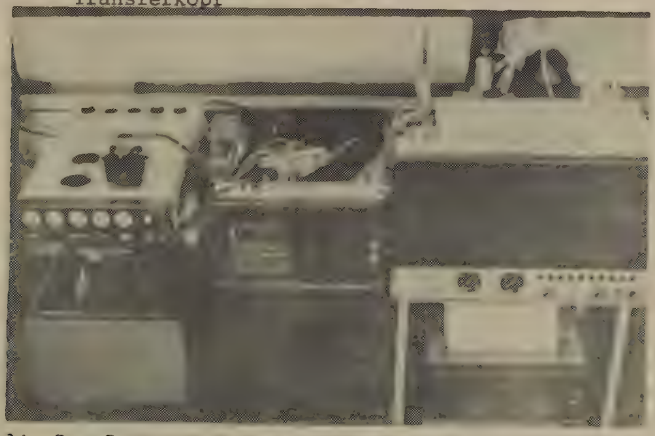


Abb. 34: Der Derivatisierungsautomat samt automatischem Probengeber und Gaschromatograph

3.4. Zusammenfassung

Es wurde ein Derivatisierungsautomat entwickelt, mit dem in Kombination mit automatischem Probengeber, Gaschromatograph und Auswertungssystem die Analyse von Substanzen auf gaschromatographischem Wege vollautomatisch ermöglicht wird. Bisher konnte dies nur mit einem großen manuellen Arbeitsaufwand geschehen. An erster Stelle ist hier die quantitative und qualitative Aminosäurebestimmung nach der Methode des Enantiomerlabellings zu nennen. In Analogie bietet sich aber auch die Analytik für viele chirale Substanzen an, die auf chiralen Phasen getrennt werden können, wie die Hydroxycarbonsäuren, chirale Alkohole und Amine, Aminoalkohol, etc. Diese Analyseverfahren in der Routineanalytik einzuführen, scheiterte an der meist mühsamen und zeitaufwendigen manuellen Probenvorbereitung, die nun entfällt.

Mit diesem Automaten können alle Umsetzungen durchgeführt werden, die

- mit relativ leicht flüchtigen Reagenzien ablaufen oder bei denen Reagenzien nicht entfernt werden müssen,
- die keine Fällungs-, Filtrations- oder Verteilungsvorgänge beinhalten,
- und die in ein- bis dreistufigen Synthesen ablaufen, wenn das Reagenz der dritten Stufe als Lösungsmittel für die Chromatographie eingesetzt werden kann, wie z.B. bei der Trimethylsilylierung.

Der Automat dieser Bauart wurde für Derivatisierungen im Halbmikromaßstab zur Chromatographie konzipiert.

Ein weiterer Vorteil kommt z.B. beim Einsatz in der Fettsäurenanalytik durch Gaschromatographie der Methylester, der Steroidanalyse durch Gaschromatographie der Trimethyl-

silylderivate oder der Aminosäureanalyse durch HPLC der Dansylderivate zum tragen: die hohe Reproduzierbarkeit.

Die Automatisierung im Labor steckt in den Kinderschuhen. Zymark bietet einen in sehr vielen Gebieten anwendbaren Laborautomaten an, der auf reges Interesse vor allem in Amerika stößt. Der Umgang mit hochaggressiven und hochflüchtigen Chemikalien bei hohen Temperaturen und entsprechenden Drucken bedeutet für ihn ein vielleicht wegen der breiten Anwendungsmöglichkeit bedingtes, kaum lösbares Problem. Der Automat für einen speziellen Anwendungsbereich leistet in dem Bereich,für den er konzipiert ist, weit mehr als ein "Universalautomat".

C. EXPERIMENTELLER TEIL

Die experimentellen Daten der gaschromatographischen Trennungen und der Aufbau der Derivatisierungsapparatur sind im vorausgegangenen Text beschrieben und werden hier nicht wiederholt.

1. Darstellung von Diazomethan

2.14 g N-Methyl-p-Toluolsulfonamid werden in 30 ml Ether gelöst und auf 0°C gekühlt. Nun wird eine Lösung von 0.4 g KOH in 10 ml 96 %igem Ethanol zugegeben. Nach weiteren 5 Minuten bei 0°C wird mit einem warmen Wasserbad erwärmt, und etherische Diazomethanlösung abdestilliert.

2. Reinigung von TEA

Zu 20 ml TEA werden 5 ml 1-Naphthylisocyanat gegeben, eine Stunde unter Rückfluß gekocht und das reine TEA abdestilliert.

3. Veresterung der α-Hydroxycarbonsäuren

3.1. Methylester mit Diazomethan

Ca. 3 mg der Probe werden in einem Reacti-vial in 0.4 ml des entsprechenden Lösungsmittels gelöst und bei Raumtemperatur mit 0.2 ml etherischer Diazomethanlösung versetzt. Ist keine Gasentwicklung mehr zu beobachten, ist die Reaktion abgeschlossen. Reagenz und Lösungsmittel werden mit Stickstoff abgeblasen.

3.2. Methylester mit Methanol/HCl

Ca. 3 mg der Probe werden in einem Reacti-vial mit 0.3 ml einer 20 %igen Lösung von Acetylchlorid in Methanol, die zu Essigsäuremethylester und HCl reagiert (Vorsicht! stark exotherme Reaktion, im Eisbad herstellen), versetzt. Der

fest verschlossene Reacti-vial wird 30 Minuten auf 110°C erhitzt. Die Reagenzien werden nach dem Abkühlen mit Stickstoff abgeblasen.
Beinhaltet die Probe die niederen Homologen der Hydroxysäuren, empfiehlt sich nicht,bis zur Trockne abzublasen, sondern die letzten 50 µl durch Zugabe von Diazomethan zu neutralisieren. Überschüssiges Diazomethan wird nach der schnell beendeten Neutralisation abgeblasen.

3.3. n-Propylester mit n-Propanol/HCl

Es wird wie in 3.2. beschrieben verfahren, nur wird anstatt Methanol n-Propanol verwendet.

4. Umsetzung der α-Hydroxycarbonsäureester zu den Urethanen

Die im Reacti-vial veresterte Probe wird mit 0.2 ml destilliertem t-Butylisocyanat (Isopropylisocyanat) und 0.2 ml TEA versetzt und 10 Minuten bei 110°C gekocht. Nach dem Abkühlen wird bis zur Trockne mit Stickstoff abgeblasen und in Methylenchlorid aufgenommen.

5. Darstellung der 2 Trimethylsiloxycarbonsäure-n-propylamiden

5.1. Aminolyse

Die Methylester, dargestellt nach 3.1. oder 3.2., werden mit 0.1 ml n-Propylamin 30 Minuten auf 110°C erhitzt. Das überschüssige Reagenz wird bei Raumtemperatur mit einem Stickstoffstrom abgeblasen.

5.2. Trimethylsilylierung

40 µl N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoracetamid werden zu der Probe gegeben und 10 Minuten auf 60°C erhitzt. Nach Abkühlen wird Lösungsmittel zugegeben.

6. Darstellung der 2-Heptafluorbutyroxycarbonsäureamide

Die Amide, die nach 5.1. dargestellt werden, werden in 500 µl Methylenchlorid gelöst und 50 µl Heptafluorbuttersäureanhydrid zugegeben. Es wird für 10 Minuten auf 110°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit einem Stickstoffstrom das überschüssige Reagenz abgeblasen und in Lösungsmittel aufgenommen.

7. Darstellung der 2-Isopropylcarbamoyloxycarbonsäureisopropylamide

1 mg der Probe werden in 300 µl Methylenchlorid gelöst und 100 µl Isopropylisocyanat zugegeben. Nach einstündigem Erhitzen auf 110°C wird bei Raumtemperatur abgeblasen und in Lösungsmittel aufgenommen.

8. Darstellung der N-TFA Aminoalkohole

Zu 1 mg Probe werden 100 µl Trifluoressigsäuremethylester gegeben. Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur wird das überschüssige Reagenz abgeblasen und in Lösungsmittel aufgenommen.

9. Darstellung der O-TMS Aminoalkohole

Zu 1 mg Proben werden 100 µl Trimethylsilylimidazol gegeben. Es wird 5 Minuten auf 60°C erhitzt, abgekühlt und in Lösungsmittel aufgenommen.

10. Darstellung der N-TFA O-TFA Aminoalkohole

Zu 1 mg Probe werden 100 µl Methylenchlorid und 50 µl Trifluoressigsäureanhydrid gegeben. Es wird 10 Minuten auf 110°C erhitzt. Überschüssiges Reagenz wird abgeblasen.

11. Darstellung der N-TFA O-TMS Aminoalkohole

Zu den wie in 8. oder 10. dargestellten Derivaten werden 100 µl Hexamethyldisilazan gegeben. Nach 10 Minuten bei 110°C wird auf Raumtemperatur abgekühlt und in Lösungsmittel aufgenommen.

12. Darstellung der N(O,S)-PFP-Aminosäure-n-propylderivate

Zur trockenen Probe werden 1 ml 6 N HCl in Propanol (20 %ige Lösung von Acetylchlorid in n-Propanol) gegeben. 1 ml Mercaptoethan wird zugegeben und das Reaktionsgemisch in einem fest verschlossenen Reacti-vial 30 Minuten bei 110°C gekocht. Nach dem Abblasen wird in Methylenchlorid (1 ml) aufgenommen und mit 50 µl PFPA versetzt. Nun wird 10 Minuten bei 110°C (bei Anwesenheit von Arg bei 150°C) gekocht. Nach dem Abkühlen auf 20°C wird vorsichtig abgeblasen (Ala, Val, Thr sind sehr flüchtig!). Es wird in Methylenchlorid aufgenommen und ca. 40 pmol in den Gaschromatographen injiziert.

13. Bestimmung der Reaktionskinetik

Ca. 5 mg Tetradecan werden als interner Standard zu 5 mg Probe gegeben. Nach der Methylierung wird das Verhältnis Standard/Probe gaschromatographisch bestimmt. Die Probe wird in fünf Teile geteilt. Das zweite Reagenz wird zugegeben. Die fünf Reaktionsgläschen werden zu unterschiedlichen Zeiten aus dem Heizblock entnommen und wieder das Verhältnis Standard/Probe gaschromatographisch bestimmt.

14. Verwendete Gaschromatographen

Es wurde mit einem Fractovap 2150 (Carlo-Erba), einem Dani 3900, einem Varian und einem Sichromat 1 (Siemens) gearbeitet. Als Trägergas wurde ausschließlich Wasserstoff benutzt. Die Strömungsgeschwindigkeit betrug 1.5 ml/min. Der Gasstrom im Einspritzblock wurde im Verhältnis von 35:1 gesplitet.

Außer dem Sichromat 1 waren alle Gaschromatographen mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) bestückt. Diese wurden zusätzlich mit Brenngasen versorgt. Es wurden 30 ml/min Wasserstoff und 400 ml/min synthetische Luft zugegeben.

Der Sichromat war mit einem stickstoffspezifischen Detektor bestückt. Dieser wurde mit

	Reaktionsluft (synthetische Luft)	10 ml/min
	Beimischung (Stickstoff)	30 ml/min
und	Reaktionsgas (H_2)	1.5 ml/min

versorgt. Bei einem Grundstrom von 820 mA zeigte er maximale Empfindlichkeit und Selektivität.

Säulen: Im wesentlichen wurden Quarzkapillaren oder desaktivierte Glaskapillaren benutzt. Für die Herstellung, Archivierung und die Bereitstellung der Kapillaren danke ich Herrn G.J. Nicholson. Die angegebenen Säulennummern beziehen sich auf sein Archiv.
Die Kapillaren hatten eine Länge von 20 Metern und einen Innendurchmesser von 0.28 mm. Die Filmdicke der stationären Phase betrug in der Regel 0.13 µm.

Integratoren: Es wurden folgende elektronische Integrationssysteme verwendet:

Spektra Physics, 4270
Spektra Physics, System 1
Hewlett-Packard, 3390 A
Trivector, Trilab 3
Perkin-Elmer, Sigma 1
sowie das Integrationssystem des Sichromat 1.

Schreiber: Es wurden im wesentlichen der Speedomax XL 681 von Leeds & Northrup (LNI, Italiana SPA) benutzt.

D. ZUSAMMENFASSUNG

Die Enantiomeren der α-Hydroxycarbonsäuren können in Form verschiedener Derivate an Chirasil-Val getrennt werden. Sie wurden auf ihre Anwendbarkeit hin getestet.
Die 2-Heptafluorbutyryloxycarboxamide und die 2-Carbamoyloxycarboxamide haben so viele Nachteile, daß sie kaum einen Anwendungsbereich finden werden. Die Trimethylsiloxycarboxamide, die 2-Carbamoyloxycarbonsäureester und die 2-Hydroxycarbonsäureester waren für die gaschromatographische Trennung gut geeignet, hatten aber auch ihre Nachteile. Das optimale Derivat für die gaschromatographische Trennung der Enantiomeren scheint es noch nicht zu geben. Je nach Anwendungsbereich muß entschieden werden, welches der drei Derivate zu wählen ist.

Des weiteren wurden die thermodynamischen Daten bestimmt, die zur Trennung führten. Daraus konnte ein Modell entwickelt werden, das nicht wie bisher einfach das Molekül als ganzes betrachtet, sondern es in Inkremente unterteilt, die jedes für sich einen mehr oder weniger großen Beitrag zur chiralen Erkennung liefert. Diese können sich ergänzen aber auch aufheben. Danach scheint es fraglich, ob solch hochkoordinierte Assoziate, wie sie oft in der Literatur beschrieben worden sind, gebildet werden. Weiterhin können Hinweise gegeben werden, wie die Enantiomeren eines chiralen Moleküls derivatisiert werden müssen, damit sie gaschromatographisch an Chirasil-Val getrennt werden können. Dies trifft vor allen Dingen dann zu, wenn das Molekül mehrere unterschiedliche funktionelle Gruppen besitzt.

Um die bei vielen Substanzgruppen notwendige Derivatisierung zu vereinfachen, wurde eine Apparatur entwickelt, die eine Automatisierung dieses Schrittes möglich macht.

Dies bringt auch eine Erhöhung der Reproduzierbarkeit mit sich. Die Einsatzmöglichkeiten dieses Automaten sind vielseitig. Als Beispiele können die Aminosäureanalyse nach der Methode des Enantiomerlabellings, die gaschromatographische Fettsäure- sowie Steroidanalytik und die Dansylierung der Aminosäuren in der HPLC genannt werden.

E. ANHANG

Abb. 1: Lineare Regression von ln α und $\frac{1}{T}$ für

		Derivat	
		Carboxyl-	Hydroxylgruppe
1)	α-OH Isovaleriansäure	Methylester	Urethan
2)	" "	Amid	HFB
3)	" "	Amid	TMS
4)	" "	Amid	Urethan
5)	Mandelsäure	Methylester	Urethan
6)	"	Amid	HFB
7)	"	Amid	TMS
8)	"	Amid	Urethan
10)	2-Amino, 1-Phenyl-ethanol	N,O-TFA	
11)	2-Amino, 1-Phenyl-ethanol	N-TFA, O-TMS	
12)	Aminooktan	N-TFA	
13)	Pentanol	Urethan	
14)	α-Phenylpropion-säure	n-Propylamid	

Abb. 2: Lineare Regression von ln α und $\frac{1}{T}$ für die N,O,S-PFP-Aminosäure-n-propylester

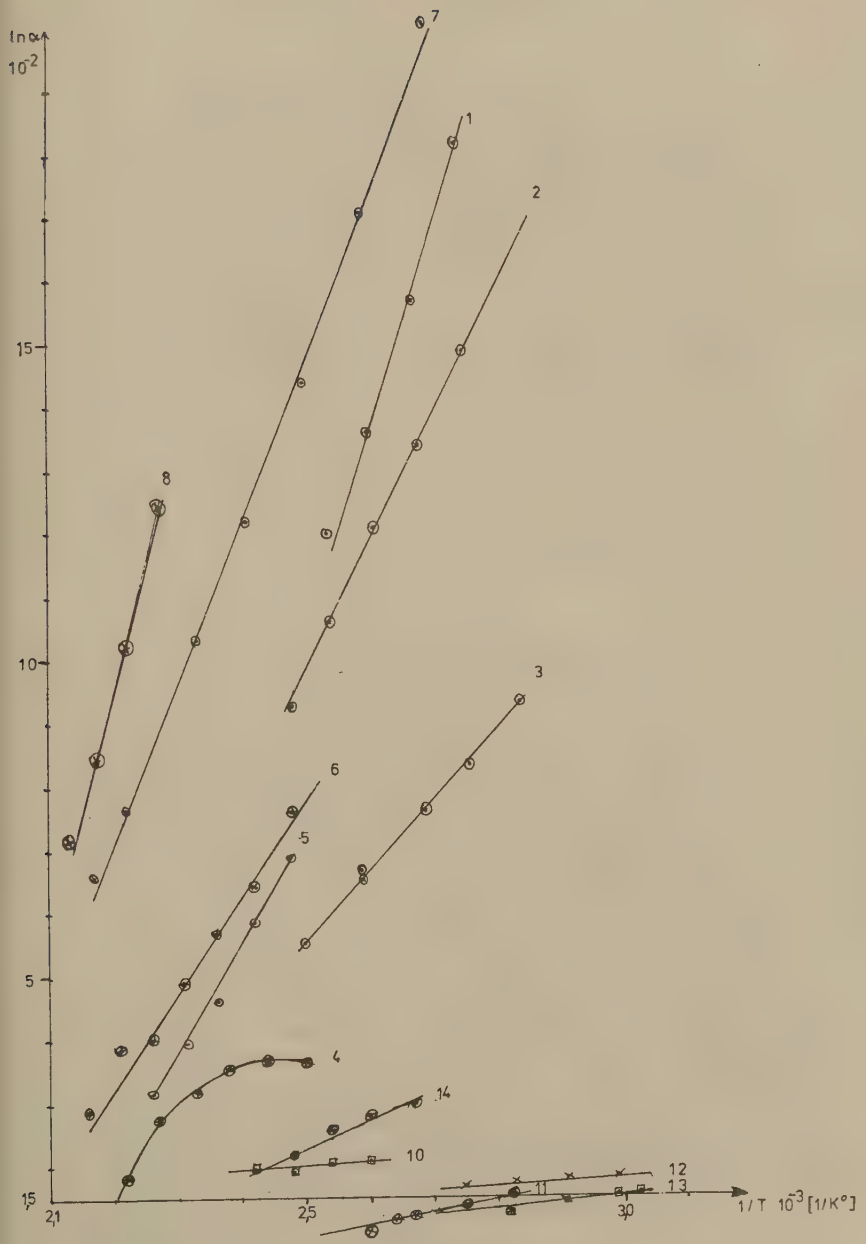


Abbildung 1

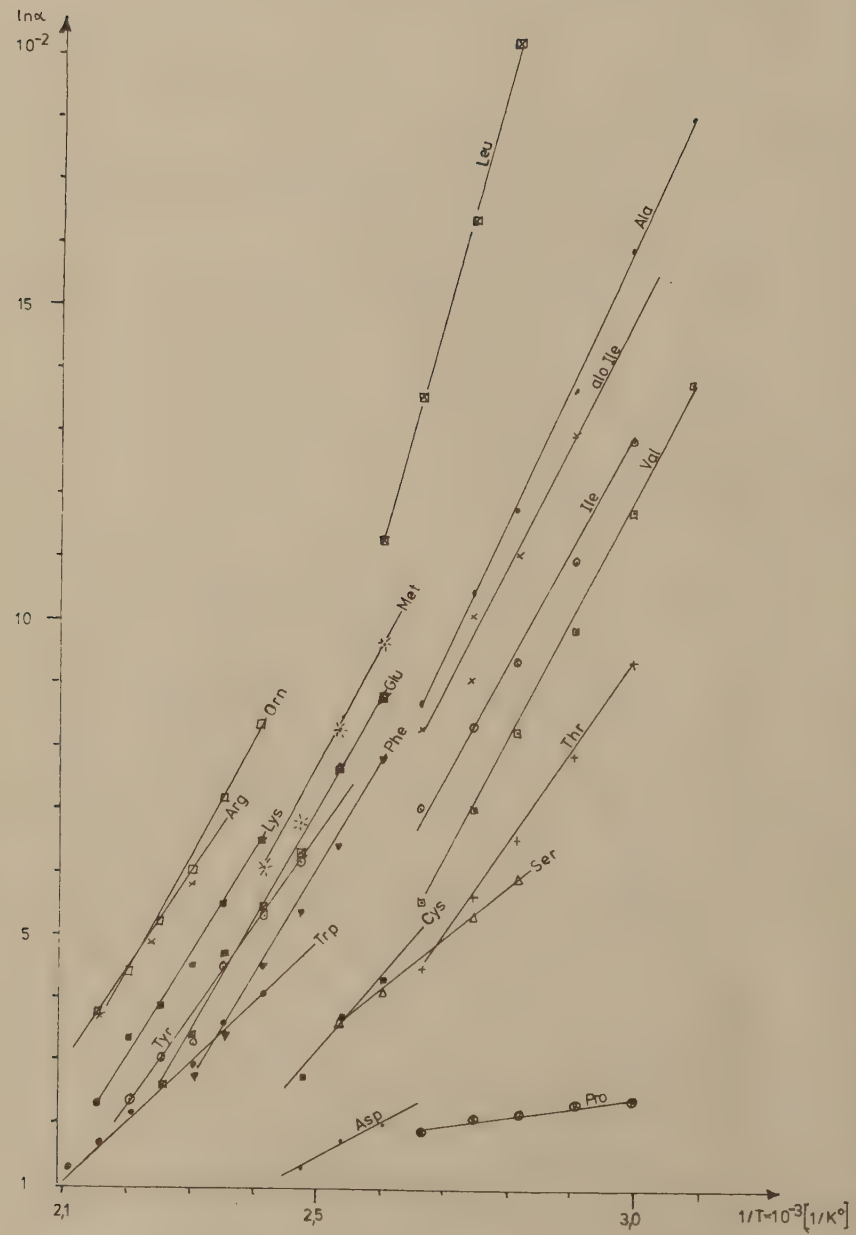

lnα
10⁻²
15
10
5
1
2,1
2,5
3,0
1/T·10⁻³[1/K°]
Leu
Ala
allo Ile
Ile
Val
Met
Glu
Orn
Arg
Lys
Phe
Thr
Ser
Cys
Trp
Tyr
Asp
Pro

Abbildung 2

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. A. Korolkovas, Grundlagen der Molekularen Pharmakologie, Thieme Verlag, Stuttgart 1974, S. 99-103.
2. P.N. Patil, J.B. LaPidus, D. Campbell, A.Tye, J. Pharm. Exp. Ther. 155, 13 (1967).
3. J.E. Wilson, V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. 184, 63 (1950).
4. H. Ockenfels, F. Köhler, Experientia 26, 1236 (1970).
5. G. Blaschke, H.P. Kraft, K. Fickentscher, F. Köhler, Arzneim. Forsch. 29, 1640 (1979).
6. W.A. König, W. Rahn, J. Eyem. J. Chromatogr. 133, 141 (1977).
7. R. Charles, G. Fischer, E. Gil-Av, Israel J. Chem. 1, 234 (1963).
8. E. Gil-Av, B. Feibush, R. Charles-Sigler in A.B. Littlewood in Gaschromatography 1966, Inst. of Petroleum London 1967, S. 227.
9. G. Blaschke, Angew. Chem. 92, 14 (1980).
10. W. Woiwode, H. Frank, G.J. Nicholson, E. Bayer, Chem. Ber. 111, 3711 (1978).
11. E. Bayer, E. Gil-Av, W.A. König, S. Naparksin, J. Oro, W. Parr, J. Am. Chem. Soc. 92, 1738 (1970).
12. H. Frank, A. Rettenmeier, H. Weicker, G.J. Nicholson, E. Bayer, Clin. Chim. Acta 105, 201 (1980).
13. H. Frank, G.J. Nicholson, E. Bayer, J. Chromatogr. 167, 187 (1978).
14. E. Gil-Av, B. Feibush, R. Charles-Sigler, Tetrahedron Lett. 1966, 1009.
15. B. Feibush, E. Gil-Av, J. Gas Chromatogr. 5, 257 (1967).
16. E. Gil-Av, J. Mol. Evol. 6, 131 (1975).
17. H. Frank, G.J. Nicholson, E. Bayer, J. Chromatogr. Sci. 15, 174 (1977).
18. B. Feibush, E. Gil-Av, Tetrahedron 26, 1361 (1970).
19. W. Parr, P. Howard, Anal. Chem. 45, 716 (1973).

20. W. Parr, P. Howard, Chromatographia 4, 162 (1971).
21. H. Frank, G.J. Nicholson, E. Bayer, Angew. Chem. 90, 396 (1978).
22. W. Parr, P. Howard, J. Chromatogr. 71, 193 (1972).
23. K. Grohmann, W. Parr, Chromatographia 5, 18 (1972).
24. W. Parr, P. Howard, J. Chromatogr. 66, 141 (1972).
25. W. Parr, P. Howard, J. Chromatogr. 67, 227 (1972).
26. J.A. Corbin, L.B. Rogers, Anal. Chem. 42, 974 (1970).
27. J.P. Kamerling, G.J. Gerwig, J.F.G. Vliegenthart, M. Duran, D. Ketting, S.K. Wadman, J. Chromatogr. 143, 117 (1977).
28. M. Brin, R.H. Dunlop, Ann. N.Y. Acad. Sci. 110, 851 (1965).
29. E. Gil-Av, R. Charles-Sigler, G. Fischer, D. Nurok, J. Gas Chromatogr. 4, 51 (1966).
30. G.E. Pollock, D.A. Jermany, J. Gas Chromatogr. 6, 412 (1968).
31. J.W. Westley, B. Halpern, J. Org. Chem. 33, 3978 (1968).
32. W. Pereira, V.A. Bacon, W. Patton, B. Halpern, G.E. Pollock, Anal. Lett. 3, 23 (1970).
33. H. Frank, G.J. Nicholson, E. Bayer, J. Chromatogr. 146, 197 (1978).
34. D. Thumm, Doktorarbeit, Universität Tübingen, 1980.
35. J. Gerhardt, Diplomarbeit, Universität Tübingen, 1981.
36. H. Frank, J. Gerhardt, G.J. Nicholson, E. Bayer, J. Chromatogr. 270, 159 (1983).
37. W.A. König, I. Benecke, S. Sievers, J. Chromatogr. 238, 427 (1982).
38. W.A. König, I. Benecke, N. Lucht, E. Schmidt, J. Schulze, S. Sievers, J. Chromatogr. 279, 555 (1983).
39. N. Oi, H. Kitahara, M. Horiba, T. Doi, J. Chromatogr. 206, 143 (1981).
40. I. Benecke, W.A. König, Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 21, 709 (1982).
41. G.J. Nicholson, H. Frank, E. Bayer, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 2, 411 (1979).

42. B. Koppenhöfer, H. Allmendinger, G.J. Nicholson, E. Bayer, J. Chromatogr. 260, 63 (1983).
43. E.W. Robb, J.J. Westbrook, III, Anal. Chem. 35, 1644 (1963).
44. J.P. Thenot, E.C. Horning, M. Stafford, M.G. Horning, Anal. Lett. 5, 217 (1972).
45. U. Beitler, B. Feibush, J. Chromatogr. 123, 149 (1976).
46. E.L. Eliel, Stereochemistry of Carbon Compounds, McGraw-Hill, New York, 1962, p. 1.
47. E. Bayer, E. Küsters, G.J. Nicholson, H. Frank, Angew. Chem., im Druck.
48. G.J. Nicholson, H. Frank, E. Bayer, HRC & CC 2, 411 (1979).
49. G. Schomburg, HRC & CC 2, 461 (1979).
50. K. Grob, G. Grob, W. Blum, W. Walter, J. Chromatogr. 244, 197 (1982).
51. S.R. Lipsky, W.J. McMurray, J. Chromatogr. 279, 59 (1983).
52. K. Stölting, W.A. König, K. Kruse, Chromatographia 10, 444 (1977).
53. K. Stölting, W.A. König, Chromatographia 9, 331 (1976).
54. S. Weinstein, B. Feibush, E. Gil-Av, J. Chromatogr. 126, 97 (1976).
55. C.H. Lochmüller, J.V. Hinshaw Jr., J. Chromatogr. 178, 411 (1979).
56. B. Feibush, A. Balan, B. Altman, E. Gil-Av, J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, (1979), 1230.
57. R. Charles, E. Gil-Av, J. Chromatogr. 195, 317 (1980).
58. B. Koppenhöfer, Dissertation, Universität Tübingen, 1980.
59. B. Feibush, E. Gil-Av, J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, (1972) 1197.
60. D. Thumm, Dissertation Universität Tübingen, 1980.
61. W.A. König, I. Benecke, J. Chromatogr. 209, 91 (1981).
62. W. Parr, C. Yang, E. Bayer, E. Gil-Av, J. Chromatogr. Sci. 8, 591 (1970).

63. W. König, W. Franke, I. Benecke, J. Chromatogr. 239, 227 (1982).
64. W. König, I. Benecke, S. Sievers, J. Chromatogr. 238, 427 (1982).
65. E. Küsters, Dissertation Universität Tübingen, 1984.
66. S.H. Langer, C. Zahn, G. Pantazoplos, J. Chromatogr. 3, 154 (1960).
67. J.H. Purnell in A.B. Littlewood, Gas Chromatography 1966, Institute of Petroleum, London 1967.
68. R.L. Laub, R.L. Pecsok, J. Chromatogr. 113, 47 (1975).
69. C.A. Wellington, Adv. Anal. Chem. Instr. 11, 237 (1973).
70. R.L. Laub, C.A. Wellington, Mol. Assoc. 2, 171 (1979).
71. C.L. de Ligny, Adv. Chromatogr. 14, 265 (1976).
72. V. Schurig, R.C. Chang, A. Zlatkis, B. Feibush, J. Chromatogr. 99, 147 (1974).
73. G. Schomburg, Gaschromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1977.
74. R.H. Liu, W.W. Ku, J. Chromatogr. 271, 309 (1983).
75. H. Frank, G.J. Nicholson, E. Bayer, J. Chromatogr. Sci. 15, 174 (1977).
76. G.C. Pimentel, A.L. McClellan, The Hydrogen Bond, W.H. Freeman 1960, San Francisco, London.
77. G.C. Pimentel, A.L. McClellan, Ann. Rev. Phys. Chem. 22, 347 (1971).
78. E.M. Arnett, L. Joris, E. Mitchell, T.S.S.R. Murty, T.M. Gorrie, P.v.R. Schleyer, J. Am. Chem. Soc. 92, 2365 (1970).
79. L.J. Bellamy, R.J. Pace, Spectrochim. Acta 25, 319 (1969).
80. G.J. Nicholson, H. Frank, E. Bayer, HRC & CC 2, 411 (1979).
81. M. Walser, Diplomarbeit Universität Tübingen, 1984.
82. H. Engelhardt, Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1975.

83. I. Halasz, G. Görlitz, Angew. Chem. 94, 50 (1982).
84. V. Meyer, Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Verlag M. Diesterweg, Otto Salle Verlag, Frankfurt am Main, Verlag Sauerländer Aarau, 1979.
85. J.F.K. Huber, R. van der Linden, E. Ecker, M. Oreans, J. Chromatogr. 83, 267 (1973).
86. P. Husek, M. Macek, J. Chromatogr. 113, 139 (1975).
87. S.P. Cram, T.H. Risby, L.R. Field, Wei-Lu Yu, Anal. Chem. 52, 324 (1980).
88. D.H. Spackman, W.H. Stein, S. Moore, Anal. Chem. 30, 1190 (1958).
89. P. Lindroth, K. Mapper, Anal. Chem. 51, 1667 (1979).
90. H. Frank, A. Rettenmeier, H. Weicker, G.J. Nicholson, E. Bayer, Anal. Chem. 54, 715 (1982).
91. H. Frank, N. Vujtovic-Ockenga, A. Rettenmeier, J. Chromatogr. 279, 507 (1983).
92. S. Moore, W.H. Stein, J. Biol. Chem. 192, 663 (1951).

Meine akademische Ausbildung verdanke ich folgenden Herren Professoren:

E. Bayer, W. Braun, E. Breitmaier, F. Gönnenwein, H. Hagenmaier, G. Häfelinger, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, D. Krug, H. Krüger, U. Kunze, E. Lindner, I.P. Lorenz, H. Mauser, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, E. Pracht, H. Rau, A. Rieker, W. Rüdorff, W. Rundel, F.F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, H. Suhr, W. Voelter, W. Zeil.

LEBENSLAUF

Am 23. September 1949 wurde ich Jürgen Gerhardt, als erstes von 5 Kindern des Biochemikers Dr. Ulrich Gerhardt und dessen Ehefrau Wanda, geb. Kowalla, in Berlin geboren. Vom Herbst 1956 bis Mai 1960 besuchte ich die Volksschule in Berlin Pankow. Nach der Flucht am 9. Mai 1960 nach Westdeutschland, die über die Aufnahmelager von Marienfelde, Uelzen und Rastatt erfolgte, war mir ein regelmäßiger Schulbesuch wieder im Juni 1960 möglich. Durch Arbeitswechsel meines Vaters bedingt, mußte ich mehrere Male die Grundschule wechseln, wobei der Weg über Mannheim, Gestorf bei Hannover nach Braunschweig ging. Hier besuchte ich dann die erste Gymnasialklasse bis Oktober 1961. Daran schloß sich von 1961 bis Mai 1966 der Besuch des Gutenberg-Gymnasiums in Mainz an. Schließlich beendete ich die Oberschule mit der Reifeprüfung im Juni 1972 am Albert-Schweitzer-Gymnasium in Leonberg. Mein sich darauf anschließendes Hochschulstudium der Chemie an der Universität Tübingen wurde von Januar bis August 1977 durch einen Krankenhausaufenthalt unterbrochen. Im September 1980 legte ich die Diplomhauptprüfung in Chemie ab. Nach meiner Hochzeit im Oktober 1980 mit Ursula, geb. Dörfler folgte vom November 1980 bis Juli 1981 die Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. E. Bayer über "Derivatisierung der α-Hydroxycarbonsäuren für die gaschromatographische Enantiomerentrennung mit Chirasil-Val, sowie Entwicklung eines Gerätes zur automatischen Derivatisierung von Aminosäuren". Der sich daran anschließende Teil der Dissertation über "Chirales Erkennen verschiedener α-Hydroxycarbonsäurederivate durch Chirasil-Val, Entwicklung eines Automaten zur Derivatisierung in der Chromatographie" wurde im Mai 1984 abgeschlossen. In dieser Zeit wurden auch unsere beiden Kinder Daniel (Mai 1982) und Heike (Dezember 1983) geboren. 1982 war ich als Assistent im organischen Praktikum beschäftigt und betreute dort die IR- und UV-Spektroskopie. Seit 1983 bin ich für den Service der gaschromatographischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie mitverantwortlich.

D. GRÄBNER
Dissertations- u. Offsetdruckerei
Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon 09545 / 8791